

DEX-0273

AC

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

世界知的所有権機関
国際事務局

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18		A1	(11) 国際公開番号 WO99/40190
			(43) 国際公開日 1999年8月12日(12.08.99)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00419</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月2日(02.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/38133 1998年2月3日(03.02.98) JP 特願平10/73234 1998年3月5日(05.03.98) JP 特願平10/134679 1998年4月28日(28.04.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 永田真粧美(NAGATA, Masami)[JP/JP] 〒206-0024 東京都多摩市諏訪5-2-10-201 Tokyo, (JP) 尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)[JP/JP] 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイド南末広7番館 Tokushima, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。</p>			
<p>(54) Title: HUMAN TSC403 GENE AND HUMAN ING1L GENE</p> <p>(54) 発明の名称 ヒトTSC403遺伝子及びヒトING1L遺伝子</p> <p>(57) Abstract TSC403 gene which is a novel gene efficacious in the fields of studying, diagnosing, treating, etc. of, in particular, lung cancer, etc. and contains a base sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1. Human ING1L gene which is a novel human gene useful in regulating and activating cell cycle and cell proliferation, studying cell aging and apoptosis, clarifying pathology of diseases such as cancer, diagnosing and treating these diseases, developing and screening novel drugs for these diseases, etc. and contains a base sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4.</p>			

本発明は、特に肺癌等の研究、診断、治療等の分野で有効な新規な遺伝子であって、配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むTSC403遺伝子を提供する。

また、本発明は、細胞周期、細胞増殖抑制及び活性化、細胞の加齢、アポトーシスの研究、癌等の疾患の病態解明、診断、治療、該疾患に対する新薬の開発、スクリーニング等に有用な新規なヒト遺伝子であって、配列番号：4で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヒトING1L遺伝子を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BF ブルガリア	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴー	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジエール	YU ユーロースラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

ヒトTSC403遺伝子及びヒトING1L遺伝子
技術分野

本発明は、ヒトの疾患の予防、診断及び治療の指針と
5 して有用な遺伝子、より詳しくは、ヒトの1amp-1
及び-2 [Lysosomal Membrane Glycoprotein; Saito,
0., et al., J. Biol. Chem., 267, 5700-5711 (1992);
Sawada, R., et al., J. Biol. Chem., 268, 12675-
12681 (1993); Sawada, R., et al., J. Biol. Chem.,
10 269, 1425-1431 (1994)]と相同性を有し、癌遺伝子とし
て働くと考えられる新規な肺特異的ヒト遺伝子に関する。

また本発明はラット、マウス、酵母、線虫、公知のヒ
ト遺伝子等と類似性を有する新規なヒト遺伝子であって、
該遺伝子のcDNA解析、染色体へのマッピング及びc
15 DNAの機能解析により、該遺伝子を用いた遺伝子診断
並びに新しい治療薬の開発に利用可能な新規なヒト遺伝
子に関する。

更に本発明は、かかる遺伝子によってコードされる新
規な蛋白質及びその特異抗体にも関する。

20

背景技術

生物の遺伝情報は、細胞の核内に存在するA、C、G
及びTの4種の塩基の並び(DNA)として蓄積され、

この遺伝情報は個々の生物の系統維持と個体発生のために保存されている。ヒトの場合、その塩基数は約30億(3×10^9)といわれ、その中に5~10万の遺伝子があると推測されている。これらの遺伝情報は、遺伝子 5 (D N A)からm R N Aが転写され、次に蛋白質に翻訳されるという流れに沿って調節蛋白質、構造蛋白質、酵素等の創製を通して、生命現象の維持に関与している。

上記遺伝子から蛋白質翻訳までの流れの異常は、細胞の増殖・分化等の生命維持システムの異常を惹起し、各種疾患の原因となるとされている。これまでの遺伝子解析の結果から、インスリン受容体やL D L受容体等の各種受容体、細胞の増殖・分化に係わる例えばプロテアーゼやA T P a s e、スーパーオキシドディスクターゼのような代謝酵素等の遺伝子が、医薬品開発にとって有用 10 な素材となると考えられた。

しかしながら、ヒト遺伝子の解析や、かかる解析された遺伝子の機能と各種疾患との関わり等についての研究は、まだ始まったばかりであり、不明な点が多く、更なる新しい遺伝子の解析、それらの遺伝子の機能解析及び 15 疾患との関わりの研究、ひいては解析された遺伝子の利用による遺伝子診断や該遺伝子の医薬用途への応用研究等が当業界で望まれている。

また、膵臓癌は、日本人及び西側諸国の癌関連死亡順位において4位及び5位を占める消化器系の悪性腫瘍の中でも最も予後不良な癌のひとつである(Poston, J. G., et al., Gut., 32, 800-812 (1991))。癌研究における

5 最も重要なゴールの一つは、癌化に至る早期の遺伝子変化を見分けることである。この変化の見極めは、早期診断のための遺伝子的なツールの開発と、この致死的な疾患をより効果的に治療するための新規な治療的アプローチと導くことができる。

10 かかる遺伝子の生理的役割の解明とそれにより得られる情報は、癌化乃至癌の発症機能の解明に重要であり、これらは、基礎科学研究の分野はもとより、医薬品分野においても上記癌の解明やその処置法等の開発面からも望まれているところである。

15 発明の開示

上記の如く、新たなヒト遺伝子が提供できれば、各細胞での発現レベルやその構造及び機能を解析でき、またその発現物の解析等により、之等の関与する疾患、例えば遺伝子病、癌等の病態解明や診断、治療等が可能となる

20 ると考えられる。本発明は、かかる新たなヒト遺伝子の提供を目的としている。

本発明者らは、上記目的より以下の如く鋭意研究を重

ねた。即ち、本発明者らは、まずヒト胎児脳、成人血管、胎盤の各種組織より抽出したmRNAよりcDNAを合成し、これをベクターに組込んでライブラリーを構築し、該ライブラリーでトランスフォームした大腸菌コロニー5を寒天培地上に形成させ、該コロニーをランダムにピックアップしてマイクロプレートに移し、各種のヒト遺伝子を含む大腸菌クローンを作製、登録した。次いで、之等の各クローンを培養後、DNAを抽出精製し、得られるcDNAを鋳型としてデオキシターミネーター法により104種の塩基特異的に停止する伸長反応を行い、自動DNAシークエンサーにより、登録された各クローンの有するヒト遺伝子の5'末端から約400塩基配列を決定した。かくして得られたヒト遺伝子の塩基配列情報より、公知のバクテリア、酵母、線虫、マウス、ヒト等の15各種動植物種に類似性を有する新規なファミリー遺伝子を検索した。尚、上記cDNA解析方法については、藤原らの文献に細述されている（藤原 力、細胞工学、14, 645-654(1995)）。

その結果、ヒト胎児脳cDNAライブラリーから任意20に選択したcDNAクローン中に、腫瘍抑制蛋白質と考えられるp33^{ING1} (GenBank A.C.No. AF001954, Garkavetsev, et al., Nature. Genet., 14, 415-420

(1996) ; Garkavetsev, et al., Mol. Cell. Biol., 17, 2014-2019 (1997); rewrite-GenBank A. C. No. AF044076) と高い相同意を有するアミノ酸配列をコードする新規な遺伝子を有するクローンを見い出した。本発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

また、本発明者らは、斯界で要望される前記の情報、殊に 1amp-1 遺伝子及び 1amp-2 遺伝子と相同意を有する新規な蛋白相同物をコードする遺伝子を提供することを目的として、各種ヒト組織由来の遺伝子につき検索を重ねた結果、該目的に合致する新しい肺特異的遺伝子の単離、同定に成功し、ここに本発明を完成するに至った。

即ち、まず第一に、本発明によれば、配列番号：1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子（以下「TSC403 遺伝子」という）、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

また、本発明によれば、TSC403 遺伝子によってコードされる蛋白質（以下「TSC403 蛋白質」という）及びこれに結合性を有する抗体が提供される。

更に、本発明によれば、以下の(a)、(b)及び(c)のいずれかのポリヌクレオチドからなる TSC403 遺伝子、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

(a) 配列番号：2で示される塩基配列又はその相補鎖を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：2で示される塩基配列からなるD N Aとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌ

5 クレオチド

(c) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも95%の相同性を有するポリヌクレオチド

更に、本発明によれば、配列番号：3に示される塩基
10 配列であるT S C 4 0 3遺伝子が提供される。

加えて、本発明によれば、配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも15の連続する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドを有する遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして
15 使用されるD N A断片が提供される。

次いで、本発明によれば、配列番号：4で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヒト遺伝子（以下「ヒトI N G 1 L遺伝子」という）が提供される。

また、本発明によれば、ヒトI N G 1 L遺伝子によつ
20 てコードされる蛋白質（以下「ヒトI N G 1 L蛋白質」という）及びこれに結合性を有する抗体が提供される。

更に、本発明によれば、以下の(a)、(b)及び(c)の

いずれかのポリヌクレオチドからなるヒトING1L遺伝子が提供される。

(a)配列番号：5で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド

5 (b)配列番号：5で示される塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むポリヌクレオチド

(c)配列番号：4で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも95

10 %の相同性を有するポリヌクレオチド

更に、本発明によれば、配列番号：6で示される塩基配列であるヒトING1L遺伝子が提供される。

加えて、本発明によれば、配列番号：5で示される塩基配列の少なくとも15の連続する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドを有する遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用されるDNA断片が提供される。

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの
20 規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、
「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のた

めのガイドライン」（特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

以下、本発明 T S C 4 0 3 遺伝子につき詳述する。

本発明 T S C 4 0 3 遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「T S C 4 0 3」と名付けられた P C R 産物の D N A 配列から演繹されるものを挙げることができる。その塩基配列は、配列番号：3に示されるおりである。

該遺伝子は、配列番号：1に示される416アミノ酸配列の新規な肺特異的蛋白質（以下「T S C 4 0 3 蛋白質」という）をコードするヒト c D N A であり、全長3198塩基からなっている。

本発明 T S C 4 0 3 蛋白質は、本発明遺伝子の発現産物として得られる。これは、F A S T A プログラム（Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U S A., 85, 2444-2448 (1988)）を利用したGenBank/EMBLデータベースの検索の結果、ヒトの 1 a m p - 1 遺伝子及び 1 a m p - 2 遺伝子（前記文献参照）と相同性を有することが確認された。

しかし、上記ヒト 1 a m p 遺伝子は、高転移性の大腸癌細胞株においてその発現が上昇し、血管内皮細胞上のE-セクレチンと結合することが知られている。この

ことから、癌の悪性化に関与するものと考えられている（前記文献参照）。

本発明 T S C 4 0 3 遺伝子も、癌に関連する遺伝子であり、癌のマーカーとして有用であると考えられる。

5 また、本発明遺伝子の染色体上の位置は、種々の癌において染色体異常が認められる第3染色体 q 2 7 である。このことからも、本発明遺伝子は、種々の癌との関連が強く示唆される。

更に、本発明 T S C 4 0 3 遺伝子は、試験した種々の癌標本においてその発現の上昇が認められることからも、癌化及び癌の悪性度を予測できるものとして価値があると考えられる。

以上のとおり、本発明 T S C 4 0 3 遺伝子及びその遺伝子産物の提供は、大腸癌、卵巣癌、子宮癌、肺癌、膵癌等の各種癌の解明、把握、診断、予防及び治療等に極めて有用な情報乃至手段を与える。また、本発明遺伝子は、上記各種癌の処置に利用される本発明遺伝子の発現を誘導する新規薬剤の開発の上でも好適に利用できる。

更に、個体或は組織における本発明遺伝子の発現又はその産物の発現の検出や、該遺伝子の変異（欠失や点変異）乃至発現異常の検出は、上記各種の癌の解明や診断において好適に利用できる。

以下、本発明ヒトING1L遺伝子につき詳述する。

本発明ヒトING1L遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「GEN-146F11」と名付けられたクローンの有するDNA配列から演繹される

5 ものを挙げることができる。その塩基配列は、配列表に示される通りである。即ち、このクローンの有する遺伝子は、配列表に配列番号：4として示される280アミノ酸残基をコードする840ヌクレオチド（核酸）のオーブンリーディングフレーム（推定アミノ酸翻訳領域、

10 その配列は配列番号：5に示す）を有しており、全長cDNAクローンの核酸配列は、配列番号：6に示すとおり1078ヌクレオチドからなっている。

該配列番号：6に示される配列において、開始コドンは92-94番目に位置しており、停止コドンは932-934に位置している。また、ポリアデニレーションシグナル様の配列(ATTAATA)は1058-1063に位置している。

本発明ヒトING1L遺伝子は、上述した通り、p33^{ING1}と高い相同意を有しており、その遺伝子情報に基づくヒト遺伝子の解析と、解析された遺伝子の機能と各種疾患との関わりについての研究に利用でき、該遺伝子と関連する疾患への遺伝子診断、遺伝子治療並びに

該遺伝子の医薬用途への応用研究に用いることが可能である。即ち、本発明ヒトING1L遺伝子によりコードされる蛋白質（遺伝子産物）の機能は、既知の相同性遺伝子のそれより類推でき、また本発明遺伝子の提供によれば、その候補遺伝子を発現ベクターに組込んでリコンビナント蛋白質を作製して、その酵素活性や結合活性等の機能を調べることもできる。殊に、本発明遺伝子は、癌遺伝子として機能すると考えられるため、この機能を利用して抗癌剤等の医薬品の開発に有用である。

10 本発明ヒトING1L遺伝子がコードする蛋白質（以下これを「ヒトING1L蛋白質」という）は、そのC末端付近の領域にZ_nフィンガーモチーフ様の配列を有しており、しかもこの領域は殊に上記p33^{ING1}と高い相同性を有すると認められる。

15 しかし、上記p33^{ING1}は、乳癌などのいくつかの癌由来細胞株において、その不活性化が報告されている〔前記文献参照〕。また近年、上記p33^{ING1}が癌抑制遺伝子産物として知られているp53を介して、細胞の増殖を負に調節していることが明らかにされた

20 [Garkavtsev, et al., *Nature*, 391, 295-298 (1998)]。更に、各種ヒト癌組織においてヒトING1L遺伝子の発現が特異的に増加している。之等のことから、ヒト

ING1L蛋白質は、p53と相互作用することによって、細胞の増殖を正に調節している可能性が考えられる。

また、本発明ヒトING1L遺伝子は、ノーザンプロット分析の結果、試験した各種臓器由来の16のヒト成5人組織の全てにおいて、その発現が認められ、大腸癌、食道癌、卵管癌、胃癌などのいくつかの癌組織においては、正常組織と比較して、その発現の増加が認められた。これらのことから、本発明遺伝子は、各種組織でのその発現の検出によって、これが関与する例えば癌などの診10断を行うことができ、惹いては細胞増殖抑制剤、制癌剤などの化合物のスクリーニングなどに有用であると考えられる。

本発明遺伝子は、具体的には配列番号：1及び4で示される各アミノ酸配列をコードする配列番号：2及び515の各塩基配列を含むポリヌクレオチド、該配列番号：2及び5で示される各塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、及び配列番号：1及び4で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも95%の相同性を有する20ポリヌクレオチドとして示される。

従って、本発明遺伝子には、例えば上記特定のアミノ酸配列において一定の改変を有するアミノ酸配列をコー

ドする遺伝子や、上記特定の塩基配列と一定の相同性を有する遺伝子が包含される。

即ち、本発明遺伝子には、配列番号：1又は：4に示されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列（改変されたアミノ酸配列）をコードする塩基配列を含む遺伝子が包含される。該改変されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子は、その利用によって改変前のアミノ酸配列をコードする本発明遺伝子が検出できるものであれば10 よい。

尚、これらアミノ酸配列の改変（変異等）は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）を利用して人為的にこれを行うこともできる。

15 上記の人為的改変手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154: 350, 367-382 (1987) ; 同 100: 468 (1983) ; Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984) ; 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編、p105 (1986) 〕
20 等の遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967) ; 同 91: 3350 (1969) ; Science, 150:

178 (1968) ; *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859 (1981) ; 同
24: 245 (1983)] 及びそれらの組合せ方法等が例示でき
る。

本発明遺伝子のひとつの態様としては、配列番号：2
5 又は 5 で示される塩基配列又はその相補鎖配列を含むポ
リヌクレオチドからなる遺伝子を例示できる。この塩基
配列は、上記アミノ酸配列（配列番号：1 又は 4）の各
アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例である。本
発明遺伝子はこれらに限らず、上記各アミノ酸残基に対
10 して任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有するこ
とも勿論可能である。該コドンの選択は、常法に従うこと
ができる。該選択に当たっては、例えば利用する宿主
のコドン使用頻度等を考慮することができる [Nucleic
Acids Res., 9: 43 (1981)]。
15 また、本発明遺伝子は、例えば配列番号：3 又は 6 の
具体例に示されるように、一本鎖 DNA の塩基配列とし
て示されるが、本発明はかかる塩基配列に相補的な塩基
配列からなるポリヌクレオチドやこれらの両者を含むコ
ンポーネントも当然に包含し、また cDNA 等の DNA
20 に限定されることもない。

更に、本発明遺伝子には、前記のとおり、配列番号：
2 又は 5 に示される塩基配列又はその相補鎖配列を含む

ポリヌクレオチドからなるものに限定されず、之等塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものが包含される。より詳しくは、配列番号：1又は4で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも95%の相同性を有するポリヌクレオチドからなるものが包含される。

また上記一定の相同性を有する塩基配列からなる遺伝子には、少なくとも、下記に掲げるようなストリンジエンントな条件下で、配列番号：2又は5で示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、一定の条件下で洗浄してもこれより脱離しないものも包含される。

その例としては、配列番号：2及び5の各塩基配列を有するDNAと、6×SSC中、65°C一夜の条件下或は50%ホルムアミドを含む4×SSC中、37°C一夜の条件下においてハイブリダイズし、2×SSC中、65°Cでの30分間の洗浄条件下においても各DNAから脱離しない塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。ここで、SSCは、標準食塩-クエン酸緩衝液(standard saline citrate; 1×SSC = 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate)である。また、上記遺伝子のより好ましい例としては、配列番号：2及び5の各塩基配列を有するDNAと、7%ポリエチレングリコール(PEG)／

10 % ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 中 6 5 ℃ 一夜の条件下においてハイブリダイズし、0. 1 × S S C / 0. 1 % S D S 中 6 5 ℃ での 3 0 分間の洗浄条件下においても各 D N A から脱離しない塩基配列を有する遺伝子 5 が挙げられる。

本発明遺伝子は、例えば配列番号：3又は6に示される具体例についての配列情報に基づいて、一般的な遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. 10 Press (1989) ; 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) 等参照]。

具体的には、本発明遺伝子を保有する適当な起源より、常法に従って c D N A ライブライリーを調製し、該ライブライリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより製造できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78: 6613 (1981) ; Science, 222: 778 (1983) 等]。

上記において、c D N A の起源としては、本発明遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養 20 細胞等、特に本発明 T S C 4 0 3 遺伝子の場合は肺組織が例示される。これらからの全 R N A の分離、m R N A の分離や精製、c D N A の取得とそのクローニング等は

いずれも常法に従い実施できる。尚、cDNAライブラリーは市販されてもいる。本発明においてはそれら市販のcDNAライブラリー、例えばクローンテック社(Clontech Lab. Inc.)より入手される各種cDNAライ

5 イブラリー等を用いることもできる。

本発明遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAにより產生される蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニング

10 により対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せ等を例示できる。

ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の

15 塩基配列に関する情報を元にして化学合成されたDNA等を用いるのが一般的であり、勿論既に取得された本発明遺伝子そのものやその断片等もかかるプローブとして良好に利用できる。

前記プローブとして用いられるヌクレオチド配列には、

20 配列番号：2又は5に対応する部分ヌクレオチド配列であって、少なくとも15個の連続した塩基配列、好ましくは20～30の範囲の連続した塩基配列を有するもの

が含まれる。また前記各配列を有する陽性クローニングそれ自体もまた該プローブとして用いることができる。

上記スクリーニングは、また、各細胞、組織より抽出、単離精製された天然抽出物の部分アミノ酸配列情報に基づき、センス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いる方法によることができる。

更に、上記スクリーニングは、上記特異抗体に代えて T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質を利用し 10 た蛋白質相互作用クローニング法 (protein interaction cloning procedure) によることもできる。

本発明においては、またディファレンシャルディスプレイ法 (Li and P., et al., *Science*, 257, 967-971 (1992)) によって、異なる条件下の細胞もしくは複数の 15 異なる細胞群間の m R N A の発現を直接比較、検討することができる。

本発明遺伝子の取得に際しては、P C R 法 [*Science*, 230: 1350 (1985)] による D N A / R N A 増幅法も好適に利用できる。殊に、ライプラリーから全長の c D N A 20 が得られ難いような場合には、レース法 (R A C E : Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6): 35 (1994))、殊に 5' - レース (5' - R A C E) 法

(Frohman, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8: 8998 (1988)] 等の採用が好適である。かかる PCR 法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報 5 に基づいて適宜設定でき、これは常法に従い合成できる。

尚、増幅させた DNA / RNA 断片の単離精製は、前記のとおり常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法等によればよい。

上記で得られる本発明遺伝子或は各種 DNA 断片は、
10 常法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74: 5463 (1977)]、マキサム-ギルバート法 [Method in Enzymology, 65: 499 (1980)] 等に従って、また簡便には市販のシークエンスキット等を用いて、その塩基配列を決定することができる。

15 本発明遺伝子の利用によれば、一般の遺伝子工学的手法を用いることにより、その遺伝子産物を容易に大量に安定して製造することができる。

本発明は、本発明にかかる T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子を含有するベクター（発現ベクター）
20 及び該ベクターによって形質転換された宿主細胞並びに該宿主細胞を培養することにより T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質を製造する方法をも提供するも

のである。

該 T S C 4 0 3 蛋白質及びヒト I N G 1 L 蛋白質の製造は、通常の遺伝子組換え技術 [Science, 224: 1431

5 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130: 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 5990 (1983)及び前記引用文献等参照] に従うことができる。

ここで宿主細胞としては、原核生物及び真核生物のいずれも用いることができる。原核生物の宿主としては、例えば大腸菌や枯草菌等の一般的に用いられるものが広く挙げられる。好適には大腸菌、とりわけエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 株に含まれるもののが例示できる。

また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞である COS 細胞 [Cell, 23: 175 (1981)] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77: 4216 (1980)] 等が例示でき、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞等が好適なものとして例示できるが、これら 20 に限定される訳ではない。

原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺

伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及びSD(シャイン・アンド・ダルガーノ)塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン(例えばATG)を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13等がよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができます。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、10 例えばpGEX-4T(Amersham Pharmacia Biotech)、pMAL-C2、pMA1-P2(New England Biolabs社)、pET21, pET21/lacq(Invitrogen社)、pBAD/His(Invitrogen社)等を例示できる。

脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には、例えばSV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)]等が例示できる。

上記以外にも既知の各種の市販ベクターを用いることが

できる。動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクターの市販品としては、例えばpEGFP-N, pEGFP-C(Clontech社)、pIND(Invitrogen社)、pcDNA3.1/His(Invitrogen社)等の動物細胞用ベクターや、pFastBacHT 5(Gibco BRL社)、pAcGHLT(PharMingen社)、pAc5/V5-His, pMT/V5-His, pMT/Bip/V5-His(以上Invitrogen社)等の昆虫細胞用ベクター等が挙げられる。

また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 1 (1983)]等が例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えばpPICZ(Invitrogen社)、pPICZ α (Invitrogen社)等が含まれる。

プロモーターとしても特に限定なく、エッシャエリヒア 15 属菌を宿主とする場合には、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PRプロモーター等を好適に利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、例えばSP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター 20 等が好ましい。酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えばpH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等を好適に利用でき

る。また動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオルインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーター等を例示できる。

尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターも好ましく利用できる。該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白として発現させるためのpGEX(Promega社)等を例示できる。

上記所望の組換えDNA(発現ベクター)の宿主細胞への導入方法(形質転換法)も特に制限はなく、一般的な各種方法を採用できる。得られる形質転換体の培養も常法に従うことができる。該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的の蛋白質が発現・產生され、形質転換体の細胞内、細胞外若しくは細胞膜上に蓄積若しくは分泌される。

上記培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

かくして得られる組換え蛋白は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作に従

って分離、精製することができる〔「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；*Biochemistry*, 25(25): 8274 (1986)；*Eur. J. Biochem.*, 163: 313 (1987) 等参照〕。

5 該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧シヨック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフ
10 ィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等が挙げられる。特に好ましい上記方法としては、本発明TSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質の特異抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

15

本発明は、上記の如くして得られる新規TSC403蛋白質及びヒトING1L蛋白質並びに之等各蛋白質の製造技術をも提供するものである。本発明蛋白質は、前記のとおり医薬分野において有用である。

20 また、本発明蛋白質は、該蛋白の特異抗体を作成するための免疫抗原としても利用できる。ここで抗原として用いられるコンポーネントは、例えば上記遺伝子工学的

手法に従って大量に產生された蛋白質或はそのフラグメントであることができ、これら抗原の利用により、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）及びモノクローナル抗体を收得することができる。

5 之等抗体の製法自体は、当業者によく理解されている所であり、本発明における抗体の製法もこれら常法に従うことができる〔続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）等参照〕。

10 例えは、抗血清の取得に際して利用される免疫動物としては、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ等の通常動物を任意に選択でき、上記抗原を使用する免疫方法や採血等もまた常法に従い実施できる。

15 モノクローナル抗体の取得も、常法に従い、上記免疫抗原で免疫した動物の形質細胞（免疫細胞）と形質細胞腫細胞との融合細胞を作成し、これより所望抗体を產生するクローンを選択し、該クローンの培養により実施することができる。免疫動物は、一般に細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択され、通常20 マウスやラット等が有利に用いられる。免疫は、上記抗血清の場合と同様にして実施でき、所望により通常のアジュバント等を抗原と併用することもできる。

尚、融合に使用される形質細胞腫細胞としても、特に限定なく、例えば p 3 (p3/x63-Ag8) [Nature, 256: 495-497 (1975)]、p 3 - U 1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7 (1978)]、
5 NS - 1 [Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976)]、
M P C - 1 1 [Cell, 8: 405-415 (1976)]、S P 2 / 0 [Nature, 276: 269-271 (1978)] 等、ラットにおける R 2 1 0 [Nature, 277: 131-133 (1979)] 等及びそれらに由来する細胞等の各種の骨髓腫細胞をいずれも使用で
10 きる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (P E G) やセンダイウイルス (H V J) 等の存在下に公知の方法に準じて行なうことができる。所望のハイブリドーマの分
15 離もまた同様に公知の方法に準じて行ない得る [Meth. in Enzymol., 73: 3 (1981); 上記続生化学実験講座等]。

目的とする抗体産生株の検索及び單一クローン化も常法により実施される。例えば抗体産生株の検索は、本発明蛋白質を抗原として利用した E L I S A 法 [Meth. in
20 Enzymol., 70: 419-439 (1980)]、ブラーク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニー (Ouchterlony) 法、ラジオイムノアッセイ等の一般に抗体の検出に用いられて

いる種々の方法に従い実施することができる。

かくして得られるハイブリドーマからの本発明抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法により培養してその培養上清として得る方法、ハイブリドーマをこれと適合性5のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得る方法等により実施される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。このようにして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することができる。

かくして得られる抗体は、本発明蛋白質に結合性を有することによって特徴付けられる。これは、本発明蛋白の精製及びその免疫学的手法による測定乃至識別等に有利に利用できる。本発明は、かかる新規な抗体をも提供15するものである。

また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の検出を行うことができる20。

本発明によれば、癌組織において発現量が増加しているT S C 4 0 3 遺伝子又はヒトI N G 1 L 遺伝子の存在

を検出するために、血液、血清などの生物学的試料を調製し、所望により核酸を抽出し、之等試料中にTSC403遺伝子又はヒトING1L遺伝子の感受性遺伝子が存在する否かを分析することが可能である。

5 また、本発明によれば、細胞又は組織における新生物、悪性の前駆障害への進行、又は予後指標の存在を検出するためには、障害を有する生物学的な試料を調製し、TSC403遺伝子又はヒトING1L遺伝子の新生物遺伝子が存在するか否かを分析できる。この方法を用いることにより細胞又は組織における新生物、悪性の前駆障害への進行又は予後指標の存在を検出することが可能である。従って、例えば癌の診断、癌治療効果の判定、予後の予測などが可能である。

該検出方法は、次のようにして実施できる。例えば、15 腫瘍患者サンプルから得られたTSC403遺伝子又はヒトING1L遺伝子に関する情報を基に、まずTSC403遺伝子又はヒトING1L遺伝子のスクリーニング及び／又はその增幅に用い得るように設計したDNA断片を作成する。該DNA断片には、次のようなものが20 含まれる。

(1) プラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンプロット法、ノーザンプロット

ト法などにおけるプローブとしての性質を有するもの、

(2) 核酸配列をポリメラーゼで増幅するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により、増幅した T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子の全部又は一部の D N A 断片

5 を得るためのプローブとしての性質を有するもの。

これら D N A 断片の作成のために、まず T S C 4 0 3

遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子と同じ配列を持つプラ

イマーを作成する。このプライマーをスクリーニング用

プローブとして用いて、生物学的試料 (核酸試料) と反

10 応させて、T S C 4 0 3 遺伝子配列又はヒト I N G 1 L

遺伝子配列を有する遺伝子の存在を確認する。

上記核酸試料は、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動又はドットプロ

ッティングで調製することができる。

15 前記スクリーニング方法としては、P C R 法を用いるのが感度の点から好ましい。該方法は、T S C 4 0 3 遺

伝子断片又はヒト I N G 1 L 遺伝子断片をプライマーと

して用いる方法であればとくに制限されず、従来公知の

方法 (Science, 230, 1350-1354 (1985)) や新たに開発さ

20 れ或いは将来使用される P C R 変法 (榊 佳之、ほか編、

羊土社、実験医学、増刊、8(9)(1990); 蛋白質・核酸・

酵素、臨時増刊、共立出版(株)、35(17)(1990)) のいずれ

であってもよい。

プライマーとして使用されるDNA断片は、化学合成したオリゴDNAであり、これらオリゴDNAは自動DNA合成装置など、例えばDNA合成装置(Pharmacia 5 LKB Gene Assembler Plus: ファルマシア社製)を使用して合成できる。合成されるプライマー(センスプライマー又はアンチセンスプライマー)の長さは、約10～50ヌクレオチド程度、より好ましくは約15～30ヌクレオチド程度が好ましく例示できる。

10 上記スクリーニングに用いられるプローブは、通常標識したプローブであるが、非標識のものであってもよい。スクリーニングはまた直接的又は間接的に標識したリガンドとの特異的結合によることもできる。プローブ及びリガンドを標識する方法は、従来技術分野として知られており、該技術にはニック・トランスレーション、ランダム・プライミング、キナーゼ処理等が含まれる。標識として用いられる物質には、このような既知の方法によって取り込ませることができる放射性標識、ビオチン、蛍光性基、化学発光基、酵素、抗体などが含まれ 15 20 る。

上記検出は常法に従って行うことができ、例えばRT-PCR [Reverse transcribed-Polymerase chain

reaction; E. S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., SanDiego, 21-27 (1991)] による RNA 増幅やノーザンプロット解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、
5 in situ RT - PCR [Nucl. Acids Res., 21: 3159-3166 (1993)] や in situ ハイブリダイゼーション等の
細胞レベルでのそれら測定、NASBA法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350: 91
10 -92 (1991)] 及び当該分野で知られている之等の変法、
その他の各種方法によりいずれも良好に実施し得る。

本発明測定法は、試料中の T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子の検出のための試薬キットを利用する事によって、簡便に実施することができる。本発明
15 は上記 T S C 4 0 3 遺伝子断片又はヒト I N G 1 L 遺伝子断片を含有する T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子の検出用試薬キットをも提供する。

該試薬キットは、少なくとも配列番号：2又は5に示される塩基配列もしくはその相補的塩基配列の一部又は
20 全てにハイブリダイズする D N A 断片を、それぞれ必須構成成分として含むことが重要である。その他の成分としては、標識剤、PCR法に必要な試薬、例えば T a q

D N A ポリメラーゼ、 デオキシヌクレオチド三リン酸、 プライマーなどを含ませることができる。

標識剤としては、 放射性同位元素や蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられる。 これらは D N A 断片自身 5 を予め該標識剤でコンジュゲートした形態であってもよい。

更に本発明試薬キットには、 測定の実施の便益のために、 適当な反応希釈液、 標準抗体、 緩衝液、 洗浄剤、 反応停止液などが含まれていてもよい。

10 本発明は、 上記測定方法を利用した癌の診断方法及び該診断方法に用いられる診断剤並びに診断用キットをも提供するものである。

また、 前記本発明測定法を利用して得られる被検試料中の T S C 4 0 3 遺伝子配列又はヒト I N G 1 L 遺伝子 15 配列を、 常法に従い直接的もしくは間接的に決定すれば、 野生型 T S C 4 0 3 遺伝子又は野生型ヒト I N G 1 L 遺伝子と相同性の高い相同物である、 T S C 4 0 3 遺伝子 又はヒト I N G 1 L 遺伝子に関連する、 新たな関連遺伝子（変異遺伝子）を見出すことができる。 従って、 本発 20 明はかかる測定と被検試料中の T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子の配列決定とによって、 被検試料中の T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子に関

連する関連遺伝子のスクリーニング方法をも提供するものである。

また、本発明の配列番号：1又は4で示されるTSC403遺伝子又はヒトING1L遺伝子がコードする蛋白質、該配列番号：1又は4において1もしくは数個乃至複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質又はこれらの断片に対する抗体(ポリクローナル又はモノクローナル抗体、以下これらを「TSC403抗体又はヒトING1L抗体」という)を利用すれば、上記野生型TSC403遺伝子、野生型ヒトING1L遺伝子、変異TSC403遺伝子及び変異ヒトING1L遺伝子の測定が可能となる。

本発明は、かかる野生型TSC403遺伝子、野生型ヒトING1L遺伝子、変異TSC403遺伝子及び変異ヒトING1L遺伝子の測定法をも提供するものである。

該測定法によれば、新生物状態の障害の程度、或いは悪性腫瘍の悪性度を、野生型TSC403遺伝子又は野生型ヒトING1L遺伝子の変化に基づいて検出することも可能である。かかる変化は、この分野における前記慣用技術によるTSC403遺伝子又はヒトING1L遺伝子の配列分析によつても決定、検出できるが、より

好みしくは上記TSC403抗体又はヒトING1L抗体を用いた測定法によって検出できる。かくして、被検試料におけるTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質の相違（変異）又はTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質の存在の有無を検出することができる。

TSC403抗体又はヒトING1L抗体を利用する本発明測定法によれば、該抗体は、例えば血液・血清などのヒトより採取した生体材料試料含有溶液から該試料に含まれるTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質を免疫沈降させ得、またポリアクリルアミドゲルのウェスタン・プロット又はイムノプロット上でTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質と反応し得る。

また、TSC403抗体又はヒトING1L抗体は、免疫組織化学的技術にこれを利用することによって、パラフィン又は凍結組織切片中のTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質を検出することができる。尚、上記TSC403抗体又はヒトING1L抗体の產生技術及び精製技術は、当該分野においてよく知られている。かかる抗体の製造、精製にはこれらの技術を適宜採用することができる。

野生型TSC403遺伝子、野生型ヒトING1L遺伝子又はそれらの変異体を検出する方法に関連するより

好みしい具体例には、モノクローナル抗体及び／又はポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法が包含される。また他の好みしい具体例としては、酵素結合イムノソルベントアッセイ法(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)、免疫放射線検定法(IRM)、免疫酵素法(IEMA)などを例示することができる。

本発明は、TSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質に対して結合活性を有する、細胞膜画分又は細胞表面上に存在するTSC403蛋白質レセプター又はヒトING1L蛋白質レセプターをも提供するものである。該TSC403蛋白質レセプター又はヒトING1L蛋白質レセプターは、例えば、これらのレセプターを含む細胞膜画分又はこれらを含む生体材料試料中に、標識したTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質を添加し、得られるレセプターと蛋白質とのコンジュゲート(TSC403蛋白質結合反応物又はヒトING1L蛋白質結合反応物)を抽出、単離、精製し、単離物のアミノ酸配列を特定することによって製造、取得することができる。かかる該TSC403蛋白質レセプター又はヒトING1L蛋白質レセプターの取得及び配列決定は、この分野で慣用される手段に従い、当業者に容易に実施できる。

本発明に係わる T S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒト I N G 1 L 蛋白質レセプター或いはこれらの断片は、これらを種々の薬剤のスクリーニング技術に利用することができる。該技術によって、これらレセプターと反応性を有する化合物（低分子化合物、高分子化合物、蛋白質、蛋白質部分断片、抗原、抗体など）をスクリーニングすることができる。かかるスクリーニングに用いられるレセプター又はその断片は、適当な固体支持体に付着させて利用することができ、また細胞表面に運ばれている溶液中の遊離物として利用することもできる。

上記薬剤スクリーニングの一例としては、例えば、T S C 4 0 3 蛋白質、ヒト I N G 1 L 蛋白質又はこれらの断片を発現する組換え蛋白質で安定して形質転換した原核生物又は真核生物の宿主細胞を、好ましくは競合的結合アッセイに利用する方法を例示することができる。また、遊離の又は固定した形態のかかる宿主細胞を、標準結合アッセイに利用する方法によることもできる。より具体的には、試験する薬剤の共存下で、T S C 4 0 3 蛋白質レセプター、ヒト I N G 1 L 蛋白質レセプター又はこれらの断片と、T S C 4 0 3 蛋白質、ヒト I N G 1 L 蛋白質又はこれらの断片とを反応させて複合体を形成させ、該複合体の形成が上記試験する薬剤によって阻害

される程度を検出することによって、上記薬剤スクリーニングを行うことができる。

かくして、本発明によれば、当該分野で既知の方法によって、供試薬剤とTSC403蛋白質レセプター、ヒトING1L蛋白質レセプター又はこれらの断片とを接触させ、次いで、得られる複合体の存在、又はTSC403蛋白質レセプター、ヒトING1L蛋白質レセプター又はそれらの断片と各々のリガンドとの複合体の存在、を測定する薬剤スクリーニング方法が提供できる。

さらに、TSC403蛋白質レセプター活性又はヒトING1L蛋白質レセプター活性を測定して、供試薬剤がTSC403蛋白質レセプター又はヒトING1L蛋白質レセプターを阻害でき、かくしてTSC403蛋白質の活性又はヒトING1L蛋白質の活性、例えば細胞増殖活性、の抑制ができるか否かを判断する。

かかる競合結合アッセイにおいて、TSC403蛋白質レセプター、ヒトING1L蛋白質レセプター又はそれらの断片は標識される。遊離のTSC403蛋白質レセプター、ヒトING1L蛋白質レセプター又はそれらの断片を、各々、複合体として存在するものと分離し、該遊離（複合体非形成）物の標識量を測定することによって得られる測定値が、供試薬剤のTSC403蛋白質

レセプターに対する結合又はヒト I N G 1 L 蛋白質レセプターに対する結合の尺度となる。またこの測定値は、
T S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒト I N G 1 L 蛋白質レセプターと、T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1
5 L 蛋白質との結合の阻害の尺度ともなる。T S C 4 0 3 蛋白質の又はヒト I N G 1 L 蛋白質の小さなペプチド(ペ
プチド疑似体)をこのようにして分析して、T S C 4 0 3 蛋白質レセプター阻害活性又はヒト I N G 1 L 蛋白質レ
セプター阻害活性を有するものとして測定することがで
10 きる。

本発明における薬剤スクリーニングのための他の方法
は、T S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒト I N G 1 L
蛋白質レセプターに対して適当な結合親和性を有する化
合物のスクリーニング法である。この方法は、概略する
15 と、多数の異なる供試ペプチド化合物をプラスチックの
ピンまたは他の物質の表面のごとき固体支持体上で合成
し、次いで該供試化合物をT S C 4 0 3 蛋白質レセプタ
ー又はヒト I N G 1 L 蛋白質レセプターと反応させ、洗
浄後、既知の方法にて、結合した反応物を検出する方法
20 である(例えば、PCT特許公開番号: WO 84-
0 3 5 6 4 号参照)。

精製されたT S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒト

I N G 1 L 蛋白質レセプターは、直接、前記薬剤スクリーニング技術に用いるプレート上に被覆することができる。また、ポリペプチドに対する非-中和抗体を用いて抗体を補足し、T S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒト
5 I N G 1 L 蛋白質レセプターを固相上に固定することができる。

さらに本発明は、競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも目的とする。T S C 4 0 3 蛋白質レセプター、ヒトI N G 1 L 蛋白質レセプター又はそれらの断片に対する結合性につき、T S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒトI N G 1 L 蛋白質レセプターに特異的に結合できる中和抗体と、試験化合物とを競合させる。かかる上記中和抗体による競合反応によれば、T S C 4 0 3 蛋白質レセプター又はヒトI N G 1 L 蛋白質レセプターの1又は
10 15 それ以上の抗原決定部位を有するいずれのペプチドの存在をも検出することが可能である。

また、薬剤スクリーニングに関し、さらなる方法としては、非機能性T S C 4 0 3 遺伝子又は非機能性ヒトI N G 1 L 遺伝子を含有する宿主真核細胞系または細胞
20 の使用が挙げられる。宿主細胞系または細胞を供試薬剤の存在下において一定期間増殖させた後、該宿主細胞の増殖速度を測定して、該供試薬剤が例えば、細胞増殖を

抑制することができるかどうかを確認する。上記増殖速度を測定する1手段には、TSC403蛋白質レセプター又はヒトING1L蛋白質レセプターの生物活性を測定する手段が包含される。

5 また本発明によれば、より活性な又は安定した形態のTSC403蛋白質の誘導体又はヒトING1L蛋白質の誘導体、又は例えば、イン・ビボ(*in vivo*)でTSC403蛋白質又はヒトING1L蛋白質の機能を高めるかもしくは妨害する薬剤を開発するために、それらが相
10 互作用する目的の生物学的に活性な蛋白質又は構造アナログ、例えばTSC403蛋白質アゴニスト又はヒトING1L蛋白質アゴニスト、TSC403蛋白質アンタゴニスト又はヒトING1L蛋白質アンタゴニスト、
TSC403蛋白質インヒビター又はヒトING1L蛋白質インヒビターなどを作製することが可能である。前記構造アナログは、例えばTSC403蛋白質又はヒト
15 ING1L蛋白質と、他の蛋白質との複合体の三次元構造を、X線結晶学、コンピューター・モデリング又はこれらの組み合わ方法によって決定することができる。また、構造アナログの構造に関する情報は、相同性蛋白質の構造に基づく蛋白質のモデリングによって得ることも
20 可能である。

上記のより活性な又は安定した形態の T S C 4 0 3 蛋白質の誘導体又はヒト I N G 1 L 蛋白質の誘導体を得る方法としては、また例えばアラニン・スキャンによる分析法を挙げることができる。該方法は、上記各蛋白質を構成するある種のアミノ酸残基をアラニン残基で置換し、得られる蛋白質の活性に対する、その影響を測定する方法である。蛋白質のあるアミノ酸残基を、このように置換し、分析して、当該蛋白質の活性や安定性に重要な領域を決定する方法である。該方法によって、より活性なまたは安定な T S C 4 0 3 蛋白質の誘導体又はヒト I N G 1 L 蛋白質の誘導体を設計することができる。

また機能性アッセイによって選択した標的一特異的抗体を単離し、次いでその結晶構造を解析することも可能である。原則として、このアプローチにより、続く薬剤の設計の基本となるファーマコア (pharmacore) を得ることができる。機能性の薬理学的に活性な抗体に対する抗体イディオタイプ抗体を生成させることによって、化学的または生物学的に生成したペプチドのバンクよりペプチドを同定したり、単離したりすることが可能である。故に選択されたペプチドもファーマコアとして作用すると予測される。

かくして、改善された T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト

I N G 1 L 蛋白質の活性もしくは安定性等を有する
T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質のインヒ
ビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用
を有する薬剤を、設計・開発することができる。

5 クローン化 T S C 4 0 3 遺伝子又はクローン化ヒト
I N G 1 L 遺伝子を用いて、十分な量の T S C 4 0 3 蛋
白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質を入手して、X線結晶学
のような分析研究を行うこともできる。さらに、本発明
の配列番号：1又は4に示されるアミノ酸配列よりなる
10 T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質の提供に
より、X線結晶学に代えるか又はこれに加えて、コンピ
ューター・モデリング技術も提供可能である。

本発明によれば、T S C 4 0 3 遺伝子含有ノックアウト・マウス(変異マウス)又はヒト I N G 1 L 遺伝子含有
15 ノックアウト・マウス(変異マウス)を作成することができる。これによってT S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G
1 L 遺伝子のどの配列部位が生体内で上記したような多
様な T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質の活
性に影響を与えるのか、即ち、T S C 4 0 3 遺伝子産物、
20 ヒト I N G 1 L 遺伝子産物、改変 T S C 4 0 3 遺伝子産
物又は改変ヒト I N G 1 L 遺伝子産物が、生体内でどの
ような機能を有するのかを確認することができる。

該方法は、遺伝子の相同組換えを利用して、生物の遺伝情報を意図的に修飾する技術であり、マウスの胚性幹細胞（E S 細胞）を用いた方法が知られている（Capeccchi, M. R., Science, 244, 1288-1292 (1989)）。

尚、上記変異マウスの作製は、この分野で既知の技術であり、この改変技術（野田哲生編、実験医学、増刊、14 (20) (1996)、羊土社）に本発明の野性型 T S C 4 0 3 遺伝子、野生型ヒト I N G 1 L 遺伝子、変異 T S C 4 0 3 遺伝子又は変異ヒト I N G 1 L 遺伝子が適用でき、これによって容易に各々の変異マウスを作製することができる。該技術の適用により、改善された T S C 4 0 3 蛋白質活性又はヒト I N G 1 L 蛋白質活性もしくはそれらの安定性を有する、T S C 4 0 3 蛋白質又はヒト I N G 1 L 蛋白質のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発することができる。

このように本発明は、本発明 T S C 4 0 3 遺伝子又はヒト I N G 1 L 遺伝子の検出用の特異プライマー及び／又は特異プローブとして使用されるDNA断片並びにそれらを用いる癌の診断法及びそのための診断キットをも提供するものである。

例えば本発明に係わる上記 T S C 4 0 3 遺伝子プロ-

5 プは、本発明 T S C 4 0 3 遺伝子に特異的な 2 種のプライマー（センスプライマー及びアンチセンスプライマー）を用いて、一般的 P C R 法に従って製造、取得することができる。かくして得られるプローブによれば、癌等の種々の組織での本発明遺伝子の発現を検出することができる。

図面の簡単な説明

10 図 1 は実施例 1 の (2) に従うノーザンプロット分析により調べた本発明 T S C 4 0 3 遺伝子のヒト組織における分布を示す図面代用写真である。

図 2 は実施例 1 の (4) に従う、各種正常組織及び癌組織の R T - P C R 分析結果を示す図面代用写真である。

15 図 3 は実施例 1 の (5) に従う、ノーザン解析による T S C 4 0 3 遺伝子のヒト組織における発現を示す図面代用写真である。

図 4 は実施例 1 の (5) に従う、ノーザン解析による T S C 4 0 3 遺伝子のヒト組織における発現を示す図面代用写真である。

20 図 5 は実施例 1 の (5) に従う、ノーザン解析による T S C 4 0 3 遺伝子のヒト組織における発現を示す図面代用写真である。

図 6 は、実施例 1 の (6) に従う、フォーカス形成試験に

おけるコントロール細胞の図面代用写真である。

図 7 は、同実施例 1 の(5)に従うフォーカス形成試験における本発明 T S C 4 0 3 遺伝子導入細胞の図面代用写真である。

5 図 8 は、本発明ヒト I N G 1 L 遺伝子によりコードされる蛋白の推定アミノ酸配列と、p 3 3^{ING1}のそれ [GenBank A. C. No. AF044076] との相同性を調べた結果を示す。

図 9 は、実施例 2 の(2)に従う 16 のヒト成人臓器由来 10 組織についてのノーザンプロット分析結果を示す図面代用写真である。

図 10 は、実施例 2 の(2)に従う大腸癌患者組織についてのノーザンプロット分析結果を示す図面代用写真である。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

実施例 1

T S C 4 0 3 遺伝子

20 (1-1) [γ - 33 P] A T P で標識した表出方法

組織特異的な手法において発現したヒト遺伝子を確認するため [γ - 33 P] A T P で標識した表出方法を用い

た。該方法の手順は本質的に以下に示すリアングの方法 (Liang P., et al., *Science*, 257, 967-971 (1992)) によった。

即ち、13のヒト組織（成人脳、胎児脳、肺、肝臓、5 胃、脾臓、脾臓、乳腺、前立腺、胎盤、精巣、腎臓及び心臓：クローンテック社製）の各々から単離したポリA RNA (0.2 μ g) を、ジエチルピロカーボネート処理された水 8 μ l 中で、3'-アンカード・オリゴdTプライマーG (T) 15MA (MはG、A及びCの混合液10 である) の 25 pmol と混合し、65°Cで5分間加熱した。この溶液に 4 μ l の 5×ファースト・ストランド緩衝液 (BRL社製)、2 μ l の 0.1M DTT (BRL社製)、1 μ l 15 の 250 mM dNTPs (BRL社製)、1 μ l のリボヌクレアーゼ・インヒビター (40 単位；TOYOB0 社製) 及び 1 μ l のスーパースクリプトII逆転写酵素 (200 単位；BRL社製) を加えた。各反応液の最終容量は 20 μ l とした。各溶液を 37°Cで 1 時間培養した後、30 μ l の蒸留した水の付加により 2.5 倍までに希釈し、使用時まで -20°Cで貯蔵した。

20 cDNA は、[γ -³³P] ATP で標識した (アマシャム社製) 3'-アンカード・プライマーの存在下でのPCRにより増幅させた。この cDNA の PCR 増幅は、

以下のとおり実施された。

即ち、各 20 μ l の P C R 混合液は、2 μ l の R T 反応混合液、2 μ l の 10 \times P C R 緩衝液（タカラ社製）、4 μ l の 2. 5 mM d N T P s、0. 25 μ l の Ex 5 T a q D N A ポリメラーゼ（5 単位/m l : タカラ社製）、[α - 33 P] A T P で標識した 25 pmol の 3' - アンカード・オリゴ - d T プライマー及び 25 pmol の 5' - プライマー（No. 20、配列番号：7 に示す配列の任意配列を有する 10 - mer デオキシオリゴヌクレオチド・プライマー）を含んでいた。また、P C R 反応は以下の条件で行なった。即ち、95 °C で 3 分間、40 °C で 5 分間及び 72 °C で 5 分間を 1 サイクルとして行ない、それから 95 °C で 0. 5 分間、40 °C で 2 分間及び 72 °C で 1 分間を 40 サイクル行ない、最後に 72 °C で 5 分間反応させた。

P C R 反応サンプルをエタノールで抽出し、フォルムアミド・シークエンシング染料中に再懸濁して、6 % アクリルアミド 7. 5 M ウレア・シークエンシング・ゲル上で反応させた。ゲルは固定することなしに乾燥させ、20 一晩オートラジオグラフィーを実施した。

(1-2) 増幅された c D N A 断片のサブ・クローニング
予め乾燥ゲルを載せた 3 M M 濾紙上にラジオアクティ

ブインクで印を付けておき、これとオートラジオグラムをあわせることにより、目的の cDNA を含むバンドが含まれるゲルを、3MM 濾紙ごと切り出した後、300 μ l の dH₂O にて 1 時間攪拌した。ポリアクリルアミド 5 ゲルと濾紙を取り除いた後、cDNA を担体として 1 μ l の 10mg / ml グリコーゲンと 0.3M NaOAc の存在下に、エタノール沈澱によって再回収し、10 μ l の dH₂O に再溶解した。再増幅のために、5 μ l のこの溶液が用いられた。PCR の条件とプライマーは最初の 10 PCR に対してと同じとした。適当な大きさの再増幅産物を第一の PCR 産物として再回収し、それからその PCR 産物を pUC118 ベクター(タカラ社製)の Hinc II 部位にクローンニングした。核酸配列は ABI 377 自動シーケンサー(アプライド・バイオ・システムズ 15 社製)によって決定した。

上記方法にて、13 のヒト組織から単離した mRNA を用いて異なる表出パターンを比較した結果、肺に特異的に発現した一つの PCR 産物を確認した。これを TSC403DD と命名した。

20 この産物は、252 ヌクレオチドからなっていた。 FASTA プログラム (Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2444-2448 (1988)) を使用

する GenBank/EMBLデータ・ベース中のDNA配列とこのヌクレオチドのデータとの比較より、このPCR産物が他の如何なる公知のDNA配列とも相同性を有しないことが明らかとなつた。

5 (1-3) cDNAのスクリーニング

ヒト正常肺cDNAライブラリーは、オリゴ(dT) + ランダムヘキサマーープライムド・ヒト正常肺cDNAと Uni-ZAPTM XR(ストラタジーン社製)を用いて、構築した。1×10⁶個のクローンの全体を上記方法によ
10 って単離し、[α -³²P]-dCTPにて標識された
cDNA断片を用いてそのスクリーニングを行なつた。
陽性クローンを選択し、それらの挿入cDNA部を
pBluescript II SK(-)中のイン・ビボに切り出した。

その結果、上記TSC403DDに対して約100の
15 プラークを確認した。この結果より、全RNA間の転写
量は、およそ0.01%であると計算された。

TSC403DDに相同する集合したcDNA配列
(TSC403)は、計算された分子量44316Da
を有する416アミノ酸の蛋白をコードする1248ヌ
20 クレオチドのオープン・リーディング・フレームを含む
3198ヌクレオチドを含んでいた。

一次配列からこの遺伝子の産物(TSC403蛋白質)

は、膜貫通ドメインを含む蛋白であることが明らかとなつた。

その染色体上の位置は、各種癌において染色体異常が認められる第3染色体q27であった。

5 また、本発明遺伝子TSC403は、ヒト1amp-1及び1amp-2と約30%のホモロジーを有していた。

(2) 組織における発現

組織におけるTSC403の発現プロファイルを調べ
10 るため、各種のヒト組織を用いたノーザンプロット分析を行つた。

ノーザン・プロット分析には、ヒトMTN (Multiple
-Tissue Northern) プロットIとII (クローンテック社
製) を使用した。cDNA断片は、T3とT7プロモー
15 ター配列のプライマー・セットを用い、PCRによって
[α -³²P] - dCTPで標識した。增幅産物を含むメ
ンプランをプレハイブリダイズ (条件は製品のプロトコ
ールに従つた) し、それから製品のプロトコールに従い、
ハイブリダイゼーションを行なつた。

20 ハイブリダイゼーション後、洗浄した膜を-80°Cで
24時間オートラジオグラフに露光した。その結果は図
1に示すとおりである。

該図において、用いたヒト組織は、心臓 (Heart)、脳 (brain)、胎盤 (Placenta)、肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、骨格筋 (S. muscle)、腎臓 (Kidney)、脾臓 (Pancreas)、脾臓 (Spleen)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (Prostate)、精巣 (Testis)、卵巣 (Ovary)、小腸 (Small intestine)、結腸 (Colon) 及び末梢血白血球 (Peripheral blood leukocyte; P. B. L.) である。

該図より、T S C 4 0 3 に相同する転写体が肺 (Lung)において特異的に観察された。

10 (3) FISH

染色体の整列のためのFISHは、公知の方法 (Takahashi E., et al., Hum. Genet., 86, 14-16 (1990))に従って、各コスミドDNAの0. 5 μ gをプローブとして使用して実施した。FISHはプロビア 15 100フィルム (フジ社製、ISO100) 又はCCD カメラ・システム (アプライド・イメージング、サイトビジョン社製) によって捕えられた。

その結果、100の典型的なR-バンド(前)分裂中期の細胞を試験したシグナルは、第3染色体のバンド 20 q27に局在していた。従って、T S C 4 0 3 の染色体の局在部位は、3q27と同定できた。

(4) RT-PCR分析による癌細胞株と癌組織における

転写物の発現

T S C 4 0 3 遺伝子の発現がヒト癌細胞株と癌組織において変異するかどうかを調べるために、4つの細胞株 (A s p c 1 (転移性腺癌, J. Natl. Cancer Inst., 5 67, 563-569 (1981)), B x p c 3 (腺癌・未分化, Cancer Invest., 4, 15-23 (1986)), M i a P a c a 2 (腺癌, Int. J. Cancer, 19, 128-135 (1977)) 及び P A N C 1 (類上皮性、胰管癌, Int. J. Cancer, 15, 741-747 (1975)) と 9 の癌組織 (東京大学医科研究所、10 中村先生より供与) の R T - P C R 分析を行なった。

即ち、全 R N A を I S O G E N (和光社製) を使用して細胞株と癌組織から単離した 1 0 μ l の全 R N A を 10 単位の R N a s e フリー D N a s e I (ベーリンガー・マインハイム社製) で 1 5 分間処理し、フェノール 15 - クロロフォルムで 2 回抽出し、エタノールで沈殿させた。一本鎖 c D N A をオリゴ d (T) とランダムプライマーを使用して Superscript ITM R N a s e H - 逆転写酵素 (ライフ・テクノロジー社製) によって合成した。2 μ l の各産物を P C R 増幅のために用いた。

20 配列番号 : 8 及び配列番号 : 9 として示す塩基配列のプライマー P 1 及び P 2 を、2 5 サイクルの P C R 増幅のために使用した。

尚、PCR反応は25ng cDNA、10μM各プライマー、2.5mM dNTP及び0.25UのEx taq DNAポリメラーゼ（タカラ社製）を含む20μl溶液中で行なった。PCR産物は、エチジウム・ブルマイト染色した1.5%アガロースゲル中に溶解させた。

上記に従い、4種の細胞株（cell lines；レーン1=AsPc-1、レーン2=BxPc-3、レーン3=MIApaca、レーン4=PANC-1）、正常膵臓組織（Normal Pancreas、レーン1及び2）、膵癌組織（Pancreatic cancer；レーン1～11）及び正常肺組織（Normal lung）をRT-PCR分析した結果は、図2に示す通りである。

該図より、TSC403発現は、正常膵臓組織（Normal pancreasレーン1及び2）においては見当らず、膵癌組織（Pancreatic cancerレーン1～11及びCell linesレーン1～4）にのみ認められることが判った。

尚、上記で利用した4種の細胞株は、それぞれATCCに寄託されたものであり、その寄託番号は次の通りである。

AspC-1；CRL-1682
BxPc-3；CRL-1687

M I A p a c a ; C R L - 1 4 2 0

P A N C - 1 ; C R L - 1 4 6 9

(5) 各種の癌における T S C 4 0 3 遺伝子の発現（ノーザンプロット解析）

5 T S C 4 0 3 遺伝子の発現を、下記に示す種々の癌組織及び正常組織m R N A サンプルを載せたプロット（インビトロゲン社製）に T S C 4 0 3 遺伝子をハイブリダイズさせて調べた（腫瘍ノーザンプロット解析）。尚、用いた各癌組織及び正常組織はいずれもインビトロゲン
10 社より購入したものである。

得られた結果を図3、図4及び図5に示す。尚、各図において用いた癌組織及び正常組織はそれぞれ次のとおりである。

図3；

15 brain tumor (脳癌組織)、brain normal (正常脳組織)、
kidney tumor…腎臓癌組織)、kidney normal (正常腎臓
組織)、liver tumor (肝臓癌組織)、liver normal (正
常肝臓組織)、lung tumor (肺癌組織)、lung normal
(正常肺組織)、breast tumor (胸癌組織)、normal
20 breast (正常胸組織)、uterine tumor (子宮癌組織)、
normal uterine (正常子宮組織)、fallopian tube
tumor (卵管 (ファロピアン) 癌組織)、normal

fallopian tube (正常卵管組織)、ovarian tumor (卵巢癌組織)、normal ovary (正常卵巢組織)。

図 4 :

esophagus tumor (食道癌組織)、normal esophagus (正常食道組織)、stomach tumor (胃癌組織)、normal stomach (正常胃組織)、colon tumor (大腸癌組織)、normal colon (正常大腸組織)、rectum tumor (直腸癌組織)、normal rectum (正常直腸組織)、thyroid tumor (甲状腺癌組織)、normal thyroid (正常甲状腺組織)、adrenal tumor (副腎癌組織)、normal adrenal (正常副腎組織)、parotid tumor (耳下腺癌組織)、normal parotid (正常耳下腺組織)、lymphoma (リンパ腫)、normal lymph node (正常リンパ腺)。

図 5 :

kidney tumor (腎臓癌組織)、normal kidney (正常腎臓組織)、ureter tumor (尿管癌組織)、normal ureter (正常尿管組織)、bladder tumor (膀胱癌組織)、normal bladder (正常膀胱組織)、stomach tumor (胃癌組織)、normal stomach (正常胃組織)、ovarian tumor (卵巢癌組織、4例)、ovarian normal (正常卵巢組織、4例)。

各図より、正常肺におけるTSC403の有意な発現

が観察された。また、乳癌（図3）、卵管癌（図3）、食道癌（図4）、大腸癌（図4）、直腸癌（図4）、甲状腺癌（図4）、耳下腺癌（図4）、尿管癌（図5）及び卵巣癌（図5、4例中2例）において、T S C 4 0 3 5 遺伝子の発現が認められた。

(6) T S C 4 0 3 遺伝子発現によるフォーカス形成試験
T S C 4 0 3 遺伝子のオープンリーディングフレーム全長を、p C D N A 3. 1 / H i s (インビトロゲン社)ベクターのB a m H I 及びX h o I サイトに導入してT 10 S C 4 0 3 遺伝子発現ベクターを得た。

次いで、上記で得られた発現ベクターを用いて、T S C 4 0 3 遺伝子が細胞癌化能を持つか否かを検討するために、N I H 3 T 3 細胞を用いたフォーカスアッセイを文献記載の方法に従い実施した (Shin, C., Shilo, B., 15 Goldfarb, M. P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 76, 5714-5718 (1979))。

結果を図6 (T S C 4 0 3 遺伝子を導入していないコントロール細胞) 及び図7 (T S C 4 0 3 遺伝子導入細胞) に示す。

20 各図の対比より明らかなるとおり、T S C 4 0 3 遺伝子を導入して細胞に該遺伝子を強制発現させたときには、図7に示されるとおり、フォーカスが明らかに形成され

た。このことから、T S C 4 0 3 遺伝子は、その遺伝子を過剰発現させることにより、細胞の悪性形質転換の一つである接触阻止現象への感受性喪失を起こし、癌化に深く係わっていることが明らかである。

5 実施例 2

ヒト I N G 1 L 遺伝子

(1) ヒト I N G 1 L 遺伝子のクローニング及びD N A シークエンシング

ヒト胎児脳 c D N A ライブラリーから任意に選択した
10 c D N A クローンの配列解析とデータベース検索により、腫瘍抑制蛋白質と考えられる p 3 3 ^{I N G 1} に高い相同意を有するアミノ酸配列をコードする c D N A を有する
一つのクローン (G E N - 1 4 6 F 1 1) を、次の通り
単離した。

15 即ち、ヒト胎児脳より抽出したm R N A をクローンテック社より購入して出発材料とした。上記m R N A より
c D N A を合成し、ベクターλ Z A P II (ストラタジーン社製) に挿入し、c D N A ライブラリーを構築した
(大塚G E Nリサーチ・インスティチュート、大塚製薬
20 株式会社)。インビボ・エキシジョン法 (in vivo
excision: Short, J. M., et al., Nucleic Acids Res.,
16, 7583-7600 (1988)) によって寒天培地上にヒト遺伝

子を含む大腸菌コロニーを形成させ、ランダムにそのコロニーをピックアップし、96 ウエルマイクロプレートにヒト遺伝子を含む大腸菌クローンを登録した。登録されたクローンは、-80°Cにて保存した。

5 次に登録した各クローンを 1. 5 ml の LB 培地で一昼夜培養し、プラスミド自動抽出装置 P I - 1 0 0 (クラボウ社製) を用いて DNA を抽出精製した。尚、コンタミした大腸菌の RNA は、RNase 处理により分解除去した。最終的に 30 μl に溶解し、2 μl はミニゲルによりおおまかに DNA のサイズ及び量をチェックした。

10 その 7 μl をシークエンス反応用に用い、残りの 21 μl は、プラスミド DNA として 4°C に保存した。

続いて T 3、T 7、或は合成オリゴヌクレオチド・プライマーを用いるサンガーらのジデオキシターミネーター法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 74, 5463-5467 (1977)) 或はジデオキシターミネーター法に PCR 法を加味した方法であるサイクルシークエンス法 (Carothers, A. M., et al., Bio. Techniques, 1, 494-499 (1989)) を実施した。之等の方

15 法は少量のプラスミド DNA (およそ 0. 1 - 0. 5 μg) をテンプレート (錆型) として 4 種の塩基を特異的に停止する伸長反応させる方法である。

20

シークエンスプライマーとして、F I T C
(fluorescein isothiocyanate) 蛍光標識したものを使
用し、T a q ポリメラーゼにより約 25 サイクル反応さ
せた。 蛍光標識した DNA 断片につき、自動 DNA シー
5 クエンサー、A L F™DNA シークエンサー（ファルマ
シア社製）により cDNA の 5' 末端側から約 400 塩
基の配列を決定した。

3' 非翻訳領域は、各遺伝子の異質性 (heterogeneity)
が高く、個々の遺伝子を区別するのに適しているので、
10 場合によっては、3' 側のシークエンスも行った。

DNA シークエンサーで得られた膨大な塩基配列情報
を、64 ビットのコンピューター DEC 3400 に転送
し、コンピューターによるホモロジー解析を行なった。該
ホモロジー解析は、UWGC G の FASTA プログラム
15 (Pearson, W. R. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad.
Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988)) によるデーターベ
ース (GenBank, EMBL) 検索により行った。

ヒト胎児脳 cDNA ライブライリーについての上記解析
方法は、藤原ら (Fujiwara, I., et al., DNA Res., 2,
20 107-111 (1991)) に詳述されている。

上記に従い、構築されたヒト胎児脳 cDNA ライブライ
リーから無作為に選択したおよそ 5040 の ESTs

(expressed sequence tags: 発現遺伝子断片の部分
DNA配列) の配列決定を実施した。

F A S T A プログラムによる Gene Bank と E M B L の配
列検索の中で、 G E N - 1 4 6 F 1 1 と命名したクロー
5 ンが、 p 3 3 ^{ING1} [GenBank A. C. No. AF001954] に高い
相同意を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を有す
ることを発見した。

上記 G E N - 1 4 6 F 1 1 クローンの持つ全長配列を
明確にするため、 T 7 DNA ポリメラーゼと合成プライ
10 マーとを使用する DNA シーケンスシングを行い、 また、
テンプレート (鑄型) としてベクター (pBluescript
vector: ストラタジーン社製 (Stratagene)) 内に挿入さ
れた二本鎖 DNA と、 プライマーとしての合成オリゴヌ
クレオチドとを使用して、 サンガーらのジデオキシ・チ
15 エーン・ターミネーション法によって、 全コード領域
を含む c DNA の塩基配列を決定し、 他のいくつかの関
連遺伝子の DNA 配列と比較した。

配列番号 : 6 に、 G E N - 1 4 6 F 1 1 クローン
(c DNA) の核酸配列を、 配列番号 : 5 に、 該クロー
20 ンのコーディング領域の核酸配列を、 また配列番号 : 4
に、 該核酸配列でコードされる推定アミノ酸配列を示す。

上記核酸配列中、 開始シグナル配列は 9 2 - 9 4 番目

の核酸残基の位置に見つけられ、これが翻訳開始コドンと推定された。推定終始コドンは、932-934番目の核酸残基の位置に見つけられた。

cDNAは、1078ヌクレオチドの長さであり、
5 280アミノ酸の推定蛋白質をコードする840塩基対のオープン・リーディング・フレームを含んでいた。

FASTAプログラムでの相同性検索により、この遺伝子が、p33^{ING1} [GenBank A.C.No. AF044076] と高い相同性を有するアミノ酸配列をコードすることが判つ
10 た。その塩基配列の相同性は、60.0%であった。

また、アミノ酸配列レベルにおいて、本発明遺伝子によりコードされる蛋白の推定アミノ酸配列と、上記p33^{ING1} [GenBank A.C.No. AF044076]との相同性を調べた結果を図8に示す。

15 図8は、アミノ酸配列を一文字表記してあり、上段は本発明遺伝子によりコードされるヒトING1L蛋白質の配列（「hING1L」と表示）を、下段はp33^{ING1}の配列（Garkavetsev, et al., *Nature. Genet.*, 14, 415-420 (1996); Garkavetsev, et al., *Mol. Cell. Biol.*,
20 17, 2014-2019 (1997), GenBank A.C.No. AF001954, 但し、この配列はその後訂正がなされており、訂正後の配列はGenBank A.C.No. AF044076に示されている。図中、

「p33^{1NG1}」と表示)を示す。

また、該図における黒塗り(黒箱)は、同一アミノ酸残基であり、網掛け(網掛け箱)は、類似アミノ酸残基である。hING1Lにおける---はギャップを示す。

5 該図より本発明遺伝子によりコードされるアミノ酸配列は、p33ING1のアミノ酸配列と58.9%(訂正されたp33^{1NG1}配列に基づいて計算)の相同性を有することが判る。

(2) ノーザンプロット分析

10 正常ヒト組織におけるヒトING1L mRNAの発現を、ランダム・オリゴヌクレオチド・プライミング法によって、標識したヒトcDNAクローンをプローブとするノーザンプロットにより評価した。

ノーザンプロット分析は、製品使用法に従い、ヒト
15 MTNプロット(Human Multiple Tissue Northern blot
; クローンテック社製)を用いて実施した。

即ち、上記クローンGEN-146F11の全配列を
PCRで増幅し、PCR増幅産物を [³²P] - dCTP
(ランダムプライムdDNAラベリングキット、ベーリ
20 ンガーマンハイム社)により標識してプローブとした。

プロットを4時間プレハイブリダイズ後、42℃で一
晩、50%ホルムアミド/5×SSC/10×デンハル

ツ溶液／2% SDS 溶液 (100 μg/ml 変性サケ精子DNA含有) の溶液中でハイブリダイズした。2×SSC／0.1% SDS にて室温下にて2回洗浄後、次いで0.2×SSC／0.1% SDS にて65℃下に5 15分間で2回洗浄した。フィルターは-70℃下で、X線フィルム (コダック社製) に対して露光した。

18時間の露光の結果を図9に示す。

図9より、試験した16のヒト成人臓器由来の組織の全て (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血及びリンパ球、図中それぞれ「Heart」、「Brain」、「Placenta」、「Lung」、「Liver」、「Skeletal Muscle」、「Kidney」、「Pancreas」、「Spleen」、「Thymus」、「Prostate」、「Testis」、「Uterus」、「Small Intestine」、「Colon」、「Peripheral blood」及び「Leukocyte」と表示) において発現が認められ、約1.5 kb 及び 1.3 kb の二つの転写体が検出された。

また、大腸癌、食道癌、卵管癌、胃癌などのいくつかの癌組織についても、ヒトTPプロット (Human Tumor Panel Blot; インビトロージェン社製) を、製品仕様書に従って用いて、同様のノーザンプロット分析を行った。

大腸癌患者組織についての結果を図10に示す。

図中、Tは大腸由来の腫瘍組織（図中T:Tumorと表示）を、Nは大腸由来の正常組織（図中N:Normalと表示）を示す。また、一組のT及びNは1人の患者由来の組織であり、図は4名の患者由来の組織の結果を示している。

5 該図より、各患者とも、正常組織と比較して癌組織において、ヒトING1L遺伝子発現量が増加していることが明らかである。

このことから、本発明ヒトING1L遺伝子は、癌の研究や治療分野において有用であり、特に癌診断への応用ができる、またヒトING1L遺伝子の発現産物に対する拮抗阻害剤を開発できれば、これは抗癌剤として利用できると考えられる。

(3) FISH、ラジエーションハイブリッド法による染色体マッピング

15 染色体の整列のためのFISHは、公知の方法 (Takahashi E., et al., *Hum. Genet.*, 86, 14-16 (1990))に従って、各コスミドDNAの0.5 μ gをプローブとして使用して実施した。FISHはプロビア100フィルム(フジ社製、ISO100)又はCCD 20 カメラ・システム(アプライド・イメージング、サイトビジョン社製)によって捕えられた。

その結果、100の典型的なR-バンド(前)分裂中期

の細胞を試験したシグナルは、ヒトING1L遺伝子の染色体座位は、4q35.1の位置にあることが判明した。

産業上の利用の可能性

5 本発明によれば、新規な肺特異的遺伝子TSC403及びこれによりコードされる蛋白質が提供される。これらの利用によれば、肺癌、膵臓癌等の癌や癌化の解明、その診断、予防及び治療等に有用な技術が提供される。

また本発明によれば、新規なヒトING1L遺伝子が
10 提供され、該遺伝子を用いれば、該遺伝子の各種組織での発現の検出、該遺伝子の発現産物であるヒトING1L蛋白質の遺伝子工学的製造及び該蛋白質に対する特異抗体の作製が可能であり、これらにより、前述したように、細胞周期や細胞増殖抑制及び活性化の研究、細胞の
15 加齢やアポトーシスなどの研究、之等が関与する疾患、例えば癌の研究や治療、診断が可能となる。また、上記ヒトING1L蛋白質に対する拮抗阻害剤、即ち、細胞増殖抑制剤、抗癌剤などの開発やスクリーニングも可能となる。

請求の範囲

1. 配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子。
2. 以下の(a)、(b)及び(c)から選ばれるいずれかのポリヌクレオチドである遺伝子：
 - (a) 配列番号：2で示される塩基配列又はその相補鎖配列を含むポリヌクレオチド
 - (b) 上記(a)のポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド
- 10 (c) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも95%の相同意を有するポリヌクレオチド。
3. ヒト遺伝子である請求項1又は2に記載の遺伝子。
4. 配列番号：3で示される塩基配列を有する請求項15 2に記載の遺伝子。
5. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも15個の連続する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。
6. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも20 15個の連続する塩基配列を有するプローブ。
7. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも15個の連続する塩基配列を有するプライマー。

8. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも
15個の連続する塩基配列を有するプローブ又は配列
番号：2で示される塩基配列の少なくとも15個の連
続する塩基配列を有するプライマーを用いて、請求項
5 1に記載の遺伝子の発現を検出する、癌の診断方法。

9. 癌が乳癌、卵管癌、食道癌、大腸癌、直腸癌、甲
状腺癌、耳下腺癌、尿管癌、卵巣癌及び膵臓癌から選
択されるものである請求項8に記載の診断方法。

10. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも
15個の連続する塩基配列を有するプローブ又は配列
番号：2で示される塩基配列の少なくとも15個の連
続する塩基配列を有するプライマーを必須成分として
含有する、癌診断用キット。

11. 請求項1に記載の遺伝子によってコードされる、
15 配列番号：1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質。

12. 請求項11に記載の蛋白質に結合性を有する抗
体。

13. 配列番号：4で示されるアミノ酸配列をコード
する塩基配列を含むヒト遺伝子。

20 14. 以下の(a)、(b)及び(c)から選ばれる
いずれかのポリヌクレオチドである遺伝子：
(a) 配列番号：5で示される塩基配列又はその相補鎖

配列を含むポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとストリンジエン
トな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

(c) 配列番号：4で示されるアミノ酸配列を含むポリ
5 ペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも
95%の相同性を有するポリヌクレオチド。

1 5. 配列番号：6で示される塩基配列を有する請求
項1 4に記載のヒト遺伝子。

1 6. 配列番号：5で示される塩基配列の少なくとも
10 15個の連続する塩基配列からなるオリゴヌクレオチ
ド。

1 7. 配列番号：5で示される塩基配列の少なくとも
15個の連続する塩基配列を有するプローブ。

1 8. 配列番号：5で示される塩基配列の少なくとも
15 15個の連続する塩基配列を有するプライマー。

1 9. 配列番号：5で示される塩基配列の少なくとも
15個の連続する塩基配列を有するプローブ又は配列
番号：5で示される塩基配列の少なくとも15個の連
続する塩基配列を有するプライマーを用いて、請求項
20 1 3に記載の遺伝子の発現を検出する、癌の診断方法。

2 0. 癌が大腸癌、食道癌、卵管癌及び胃癌から選択
されるものである請求項1 9に記載の診断方法。

2 1. 配列番号：5で示される塩基配列の少なくとも
1 5 個の連続する塩基配列を有するプローブ又は配列
番号：2で示される塩基配列の少なくとも1 5 個の連
続する塩基配列を有するプライマーを必須成分として
5 含有する、癌診断用キット。

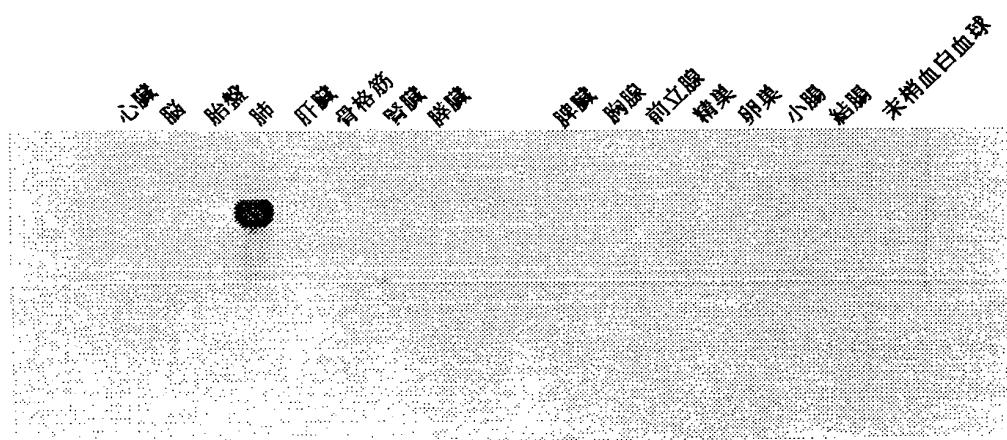
2 2. 請求項1 3に記載の遺伝子によってコードされ
る、配列番号：4で示されるアミノ酸配列を有する蛋
白質。

2 3. 請求項2 2に記載の蛋白質に結合性を有する抗
10 体。

15

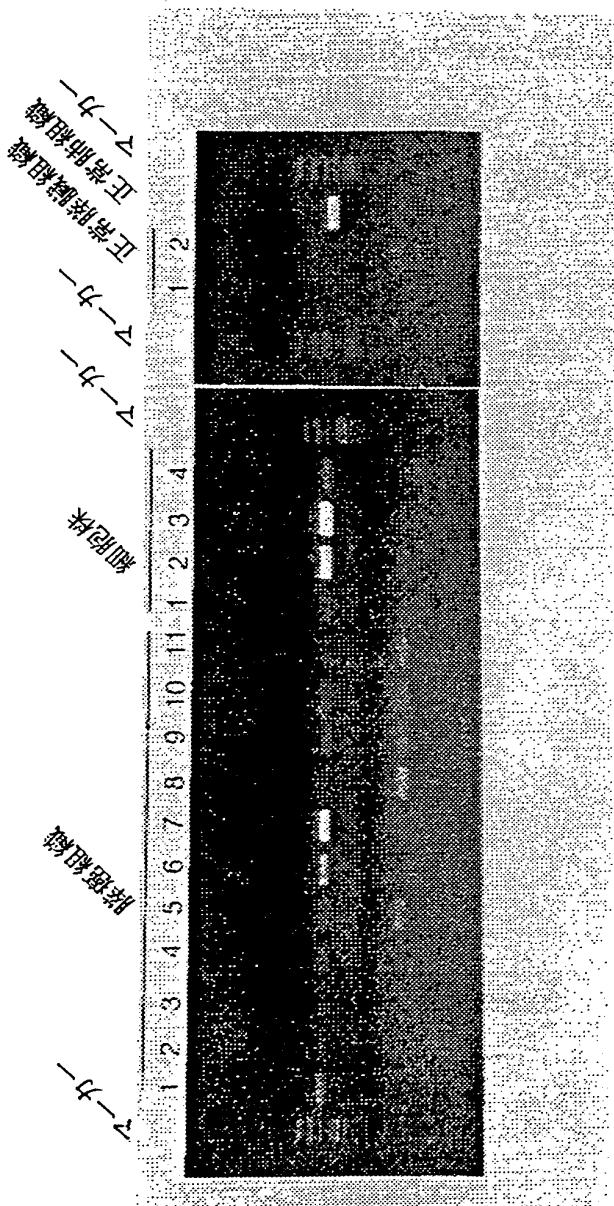
20

1/10

F I G. 1

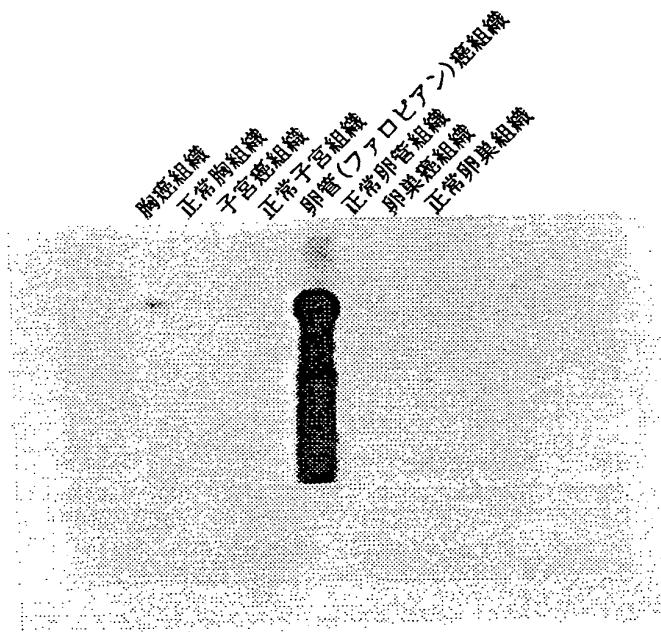
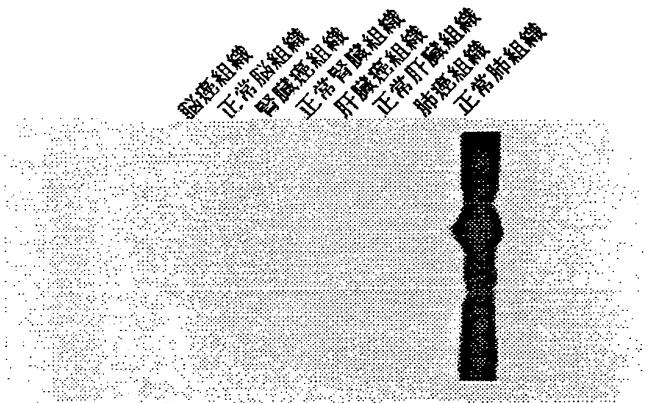
差替え用紙 (規則26)

F I G. 2



差替え用紙 (規則26)

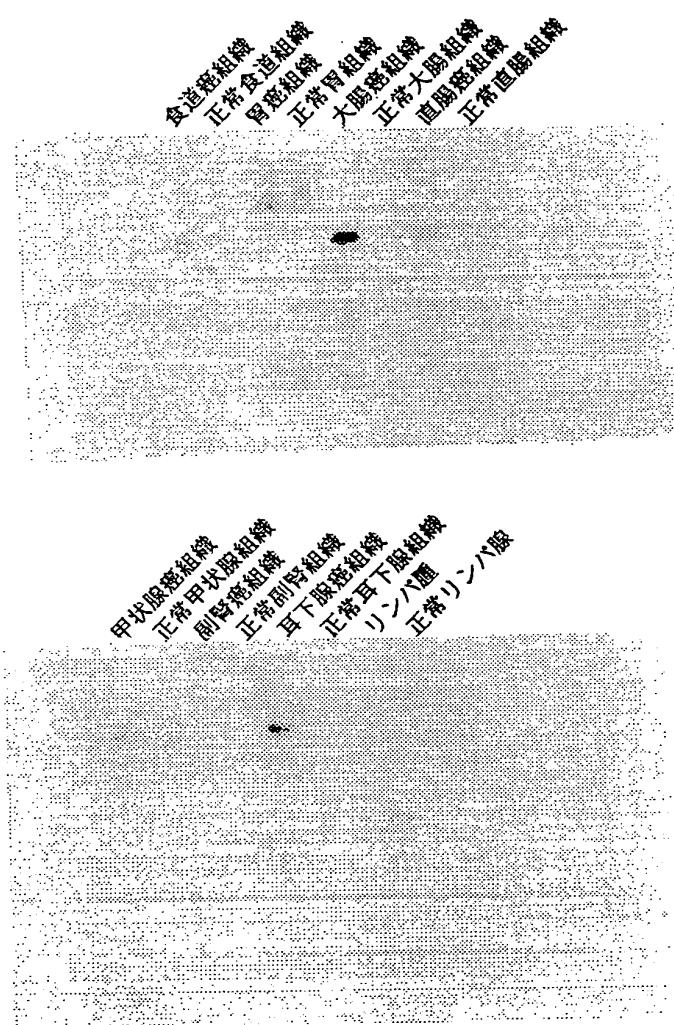
F I G. 3



差替え用紙 (規則26)

4/10

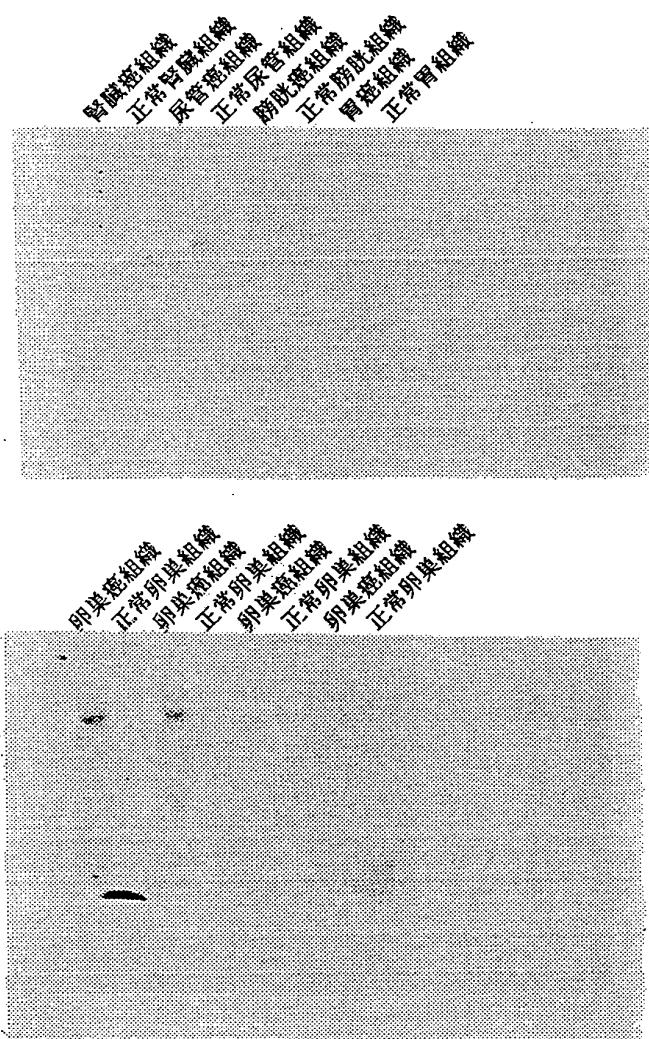
F I G. 4



差替え用紙 (規則26)

5/10

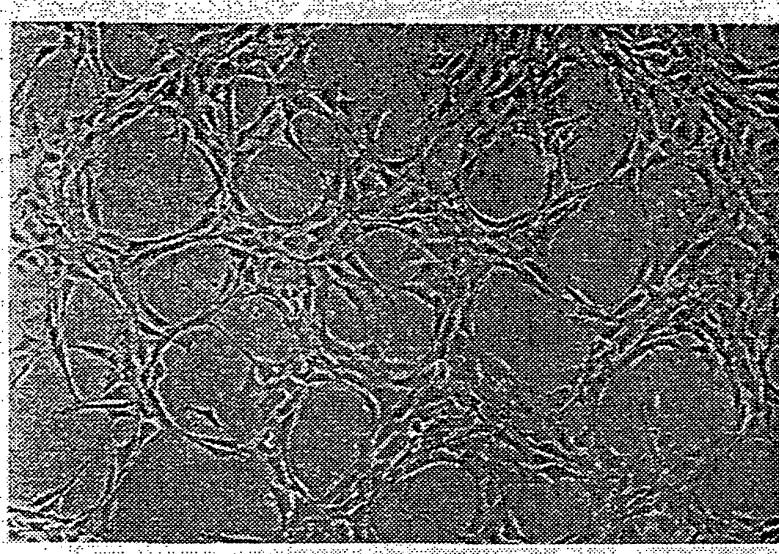
F I G. 5



差替え用紙 (規則26)

6/10

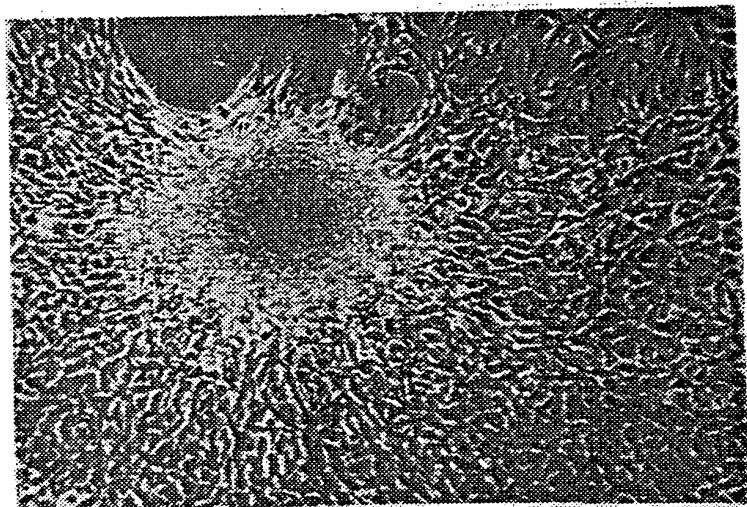
F I G. 6



差替え用紙 (規則26)

7/10

F I G. 7



差替え用紙（規則26）

8/10

F I G. 8

hING1L	MLGQQQQQLYSSAALLTGERSRLETCVYDYL	50
p33ING1	MLSPANGEQOLHUN-YVVEDYLD	38
hING1L	EDNKYQETLREIDDVYEREDLNQFERTRQQQL	100
p33ING1	EDNARYQETLREIDDVYEREDLNQFERTRQQQL	88
hING1L	IQTIVQNLVELVENRQOMELHESCFQDPAE-SERASDK	145
p33ING1	IQTIVQNLVELVENRQOMELHESCFQDPAE-SERASDK	138
hING1L	-----ERRRORTSESRDLCHMANGIEDCDDOEPKREKK	190
p33ING1	VAQSDKPNQRNRQNNNRENASSNHDHDDGASGNDPENGDA	188
hING1L	RSKAKQEREASPFADPNEPTYCLCNQSYGEMIGCDNE	240
p33ING1	RSKAKQEREASPFADPNEPTYCLCNQSYGEMIGCDNE	238
hING1L	SCVGLNLNHPKGKWCPKCRGDNNEKTMDKSTEKAKDRRSR	280
p33ING1	SCVGLNLNHPKGKWCPKCRGDNNEKTMDKSTEKAKDRRSR	279

9/10

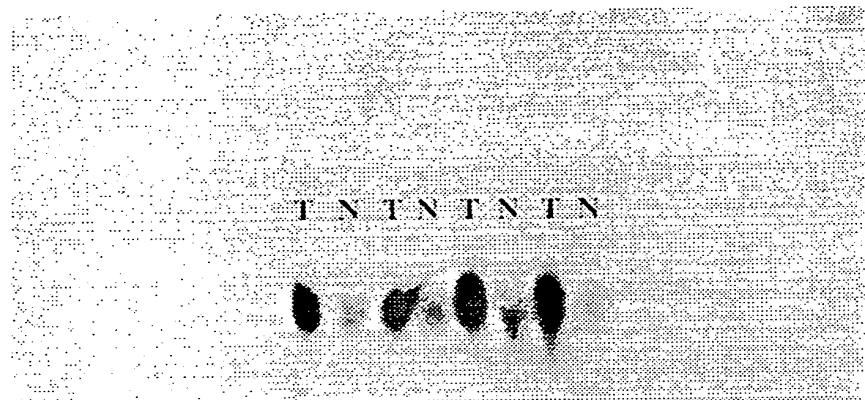
F I G. 9



差替え用紙 (規則26)

10/10

F I G. 10



T : 腫瘍組織
N : 正常組織

差替え用紙 (規則26)

SEQUENCE LISTING

<110> Ostuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> TSC403 gene and human ING1L gene

<130> P99-04

<140>

<141>

(150) JP H10-38133, JP H10-73234 and JP H10-134679

<151> 1998-02-03, 1998-03-05 and 1998-04-28

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 416

<212> PRT

<213> human normal lung cDNA library

<400> 1

Met Pro Arg Gln Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Leu Ala

1 5 10 15

Val Ile Leu His Asp Gly Ser Gln Met Arg Ala Lys Ala Phe Pro Glu

20 25 30

Thr Arg Asp Tyr Ser Gln Pro Thr Ala Ala Ala Thr Val Gln Asp Ile

35 40 45

Lys Lys Pro Val Gln Gln Pro Ala Lys Gln Ala Pro His Gln Thr Leu

50 55 60

Ala Ala Arg Phe Met Asp Gly His Ile Thr Phe Gln Thr Ala Ala Thr

65 70 75 80

Val Lys Ile Pro Thr Thr Pro Ala Thr Thr Lys Asn Thr Ala Thr

85 90 95

2/13

Thr Ser Pro Ile Thr Tyr Thr Leu Val Thr Thr Gln Ala Thr Pro Asn
100 105 110
Asn Ser His Thr Ala Pro Pro Val Thr Glu Val Thr Val Gly Pro Ser
115 120 125
Leu Ala Pro Tyr Ser Leu Pro Pro Thr Ile Thr Pro Pro Ala His Thr
130 135 140
Ala Gly Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser His Thr Thr Gly Asn Thr Thr
145 150 155 160
Gln Pro Ser Asn Gln Thr Thr Leu Pro Ala Thr Leu Ser Ile Ala Leu
165 170 175
His Lys Ser Thr Thr Gly Gln Lys Pro Asp Gln Pro Thr His Ala Pro
180 185 190
Gly Thr Thr Ala Ala Ala His Asn Thr Thr Arg Thr Ala Ala Pro Ala
195 200 205
Ser Thr Val Pro Gly Pro Thr Leu Ala Pro Gln Pro Ser Ser Val Lys
210 215 220
Thr Gly Ile Tyr Gln Val Leu Asn Gly Ser Arg Leu Cys Ile Lys Ala
225 230 235 240
Glu Met Gly Ile Gln Leu Ile Val Gln Asp Lys Glu Ser Val Phe Ser
245 250 255
Pro Arg Arg Tyr Phe Asn Ile Asp Pro Asn Ala Thr Gln Ala Ser Gly
260 265 270
Asn Cys Gly Thr Arg Lys Ser Asn Leu Leu Asn Phe Gln Gly Gly
275 280 285
Phe Val Asn Leu Thr Phe Thr Lys Asp Glu Glu Ser Tyr Tyr Ile Ser
290 295 300
Glu Val Gly Ala Tyr Leu Thr Val Ser Asp Pro Glu Thr Val Tyr Gln
305 310 315 320
Gly Ile Lys His Ala Val Val Met Phe Gln Thr Ala Val Gly His Ser

3/13

325	330	335
Phe Lys Cys Val Ser Glu Gln Ser Leu Gln Leu Ser Ala His Leu Gln		
340	345	350
Val Lys Thr Thr Asp Val Gln Leu Gln Ala Phe Asp Phe Glu Asp Asp		
355	360	365
His Phe Gly Asn Val Asp Glu Cys Ser Ser Asp Tyr Thr Ile Val Leu		
370	375	380
Pro Val Ile Gly Ala Ile Val Val Gly Leu Cys Leu Met Gly Met Gly		
385	390	395
Val Tyr Lys Ile Arg Leu Arg Cys Gln Ser Ser Gly Tyr Gln Arg Ile		
405	410	415

<210> 2

<211> 1248

<212> DNA

<213> human normal lung cDNA library

<400> 2

atggccccggc agctcagcgc ggcggccgct ccttcgcgt cccggccgt aatttgcac	60
gaatggcagtc aaatgagagc aaaagcattt ccagaaacca gagatttttc tcaacctact	120
gcagcagcaa cagttacagga cataaaaaaa ccgtttccagc aaccagctaa gcaaggcacct	180
cacccaaactt tagcagcaag attcatggat ggtcataatca cttttcaaaac agcggccaca	240
gtaaaaaaaaa caacaactac cccagcaact acaaaaaaca ctgtcaaccac cagcccaatt	300
acciacacccc tggtcacaac ccaggccaca cccaaacact cacacacagc ttcttcagtt	360
actgaagttt cagtcggccc tagcttagcc ctttattcac tggccaccac catcacccca	420
ccagcata cagtcggaaac cagttatca accgtcagcc acacaactgg gaacaccact	480
caacccatgtt accagaccac cttttccagca actttatcga tagcactgca caaaagcaca	540
accgggtcaga agccgtatca accccacccat gccccaggaa caacggcagc tgccccacaat	600
accacccgca cagtcggacc tggccatccacgttttccatggc ccacccatgc acctcagcca	660
tgcgtcagtc agacgtttaatcagggtt ctaaacggaa gcagacatgt tataaaagca	720

gaga gggg tacagctgat t ttt caagac aaggagtcgg t ttttt cacc tcggagatac	780
t ttt caacatcg accccaacgc aacgcaagcc tctgggaact gtggcacccg aaaatccaac	840
cttcttgta attttcaggg cggatttgc aatctcacat ttaccaagga tgaagaatca	900
tatataatca gtgaaggggg agcctat tt g accgc tc tcg a tt ccagagac agtttacca	960
ggaatcaa ac atgcggg gtt gttccag acagcagtcg ggcattcc tt caagtg cg tg	1020
agtgaa caga g cc cc cc gtt g cc cc cc ac c tc cagg tg aa aacaaccga tgc cc actt	1080
caagcc tt g a ttt gaaga t g accac tt ggaaat tg gg a tt gat tg ctc gtctgactac	1140
acaattgtgc t cc ctg tg at t gggg ccatc g gg g tt gg tc t tc gc tt at gg gt	1200
gtctataaaa tccgc ta ag g tg tcaatca t cg gatacc agagaatc	1248

<210> 3

<211> 3198

<212> DNA

<213> human normal lung cDNA library

<220>

<221> CDS

<222> (64)..(1311)

<400> 3

ggcacccgatt cggggcc tgc ccggact tgc c cc gcacgc tgc cagaacc tgc cccagcgccc	60
acc atg ccc cgg cag ctc agc g c g c g c g c ctc t c g c t c c t g c	108
Met Pro Arg Gln Leu Ser Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Leu	
1 5 10 15	
g c c t a t t t g c a c t g a t t g c a t g t c a a a g c a a g c t t c c	156
Ala Val Ile Leu His Asp Gly Ser Gln Met Arg Ala Lys Ala Phe Pro	
20 25 30	
gaa acc aga g a t a t c t c a a c c t a g c a c a a g t a c g a c a	204
Glu Thr Arg Asp Tyr Ser Gln Pro Thr Ala Ala Ala Thr Val Gln Asp	
35 40 45	
ata a a a a a a c c t g c a g a c a g c a a g c c c t c a c a a a c	252

5/18

Ile Lys Lys Pro Val Gln Gln Pro Ala Lys Gln Ala Pro His Gln Thr			
50	55	60	
tta gca gca aga ttc atg gat ggt cat atc acc ttt caa aca gcg gcc			300
Leu Ala Ala Arg Phe Met Asp Gly His Ile Thr Phe Gln Thr Ala Ala			
65	70	75	
aca gta aaa att cca aca act acc cca gca act aca aaa aac act gca			348
Thr Val Lys Ile Pro Thr Thr Pro Ala Thr Thr Lys Asn Thr Ala			
80	85	90	95
acc acc agc cca att acc tac acc ctt gtc aca acc cag gcc aca ccc			396
Thr Thr Ser Pro Ile Thr Tyr Thr Leu Val Thr Thr Gln Ala Thr Pro			
100	105	110	
aac aac tca cac aca gct cct cca gtt act gaa gtt aca gtc ggc cct			444
Asn Asn Ser His Thr Ala Pro Pro Val Thr Glu Val Thr Val Gly Pro			
115	120	125	
agc tta gcc cct tat tca ctt cca ccc acc atc acc cca cca gct cat			492
Ser Leu Ala Pro Tyr Ser Leu Pro Pro Thr Ile Thr Pro Pro Ala His			
130	135	140	
aca gct gga acc agt tca tca acc gtc agc cac aca act ggg aac acc			540
Thr Ala Gly Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser His Thr Thr Gly Asn Thr			
145	150	155	
act caa ccc agt aac cag acc acc ctt cca gca act tta tcg ata gca			588
Thr Gln Pro Ser Asn Gln Thr Thr Leu Pro Ala Thr Leu Ser Ile Ala			
160	165	170	175
cgt cac aaa agc aca acc ggt cag aag cct gat caa ccc acc cat gcc			636
Leu His Lys Ser Thr Thr Gly Gln Lys Pro Asp Gln Pro Thr His Ala			
180	185	190	
cca gga aca acg gca gct gcc cac aat acc acc cgc aca gct gca ccc			684
Pro Gly Thr Thr Ala Ala Ala His Asn Thr Thr Arg Thr Ala Ala Pro			
195	200	205	

6/13

gcc tcc acg gtt cct ggg ccc acc ctt gca cct cag cca tcg tca gtc	732
Ala Ser Thr Val Pro Gly Pro Thr Leu Ala Pro Gln Pro Ser Ser Val	
210 215 220	
aag act gga att tat cag gtt cta aac gga agc aga ctc tgc ata aaa	780
Lys Thr Gly Ile Tyr Gln Val Leu Asn Gly Ser Arg Leu Cys Ile Lys	
225 230 235	
gca gag atg ggg ata cag ctg att gtt caa gac aag gag tcg gtt ttt	828
Ala Glu Met Gly Ile Gln Leu Ile Val Gln Asp Lys Glu Ser Val Phe	
240 245 250 255	
tca cct cggtt gaa tac ttc aac atc gac ccc aac gca acg caa gcc tct	876
Ser Pro Arg Arg Tyr Phe Asn Ile Asp Pro Asn Ala Thr Gln Ala Ser	
260 265 270	
ggg aac tgc acc cga aaa tcc aac ctt ctg ttg aat ttt cag ggc	924
Gly Asn Cys Gly Thr Arg Lys Ser Asn Leu Leu Leu Asn Phe Gln Gly	
275 280 285	
gga ttt gtg aat ctc aca ttt acc aag gat gaa gaa tca tat tat atc	972
Gly Phe Val Asn Leu Thr Phe Thr Lys Asp Glu Glu Ser Tyr Tyr Ile	
290 295 300	
agt gaa gtg gga gcc tat ttg acc gtc tca gat cca gag aca gtt tac	1020
Ser Glu Val Gly Ala Tyr Leu Thr Val Ser Asp Pro Glu Thr Val Tyr	
305 310 315	
caa gga atc aaa cat gcg gtg atg ttc cag aca gca gtc ggg cat	1068
Gln Gly Ile Lys His Ala Val Val Met Phe Gln Thr Ala Val Gly His	
320 325 330 335	
tcc ttc aag tgc gtg agt gaa cag agc ctc cag ttg tca gcc cac ctg	1116
Ser Phe Lys Cys Val Ser Glu Gln Ser Leu Gln Leu Ser Ala His Leu	
340 345 350	
cag gtg aaa aca acc gat gtc caa ctt caa gcc ttt gat ttt gaa gat	1164
Gln Val Lys Thr Thr Asp Val Gln Leu Gln Ala Phe Asp Phe Glu Asp	

7/13

9/13

65	70	75	80
Arg Leu Gln Gln Leu Leu Gln Arg Ala Leu Ile Asn Ser Gln Glu Leu			
85	90	95	
Gly Asp Glu Lys Ile Gln Ile Val Thr Gln Met Leu Glu Leu Val Glu			
100	105	110	
Asn Arg Ala Arg Gln Met Glu Leu His Ser Gln Cys Phe Gln Asp Pro			
115	120	125	
Ala Glu Ser Glu Arg Ala Ser Asp Lys Ala Lys Met Asp Ser Ser Gln			
130	135	140	
Pro Glu Arg Ser Ser Arg Arg Pro Arg Arg Gln Arg Thr Ser Glu Ser			
145	150	155	160
Arg Asp Leu Cys His Met Ala Asn Gly Ile Glu Asp Cys Asp Asp Gln			
165	170	175	
Pro Pro Lys Glu Lys Lys Ser Lys Ser Ala Lys Lys Lys Lys Arg Ser			
180	185	190	
Lys Ala Lys Gln Glu Arg Glu Ala Ser Pro Val Glu Phe Ala Ile Asp			
195	200	205	
Pro Asn Glu Pro Thr Tyr Cys Leu Cys Asn Gln Val Ser Tyr Gly Glu			
210	215	220	
Met Ile Gly Cys Asp Asn Glu Gln Cys Pro Ile Glu trp Phe His Phe			
225	230	235	240
Ser Cys Val Ser Leu Thr Tyr Lys Pro Lys Gly Lys trp Tyr Cys Pro			
245	250	255	
Lys Cys Arg Gly Asp Asn Glu Lys Thr Met Asp Lys Ser Thr Glu Lys			
260	265	270	
Thr Lys Lys Asp Arg Arg Ser Arg			
275	280		

<210> 5

10/13

<211> 840

<212> DNA

<213> human embryonic brain cDNA library

<400> 5

aigtttagggc	agcagcagca	gcaacigtac	tcglcggccg	cgcicctgac	cggggagcgg	60
agccggctgc	tcacctgtca	cgigcaggac	taaccttgagt	gcgtggagtc	gctgccccac	120
gacatgcaga	ggaacgigic	tgtgcigcga	gagciggaca	acaaatatac	agaaacgtta	180
aaggaaatig	atgaatgtca	cgaaaaatat	aagaaagaag	aigatttaaa	ccagaagaaaa	240
cgtctacagc	agcttctccca	gagagcacta	atataatagtc	aagaattggg	agatgaaaaaa	300
atacagatig	ttacacaaat	gtctgaatlg	gtggaaaatc	gggcaagaca	aatggagttt	360
cactcacagt	gttccaaga	tccctgtcaa	agigaacgag	cctcagataa	agcaaagatg	420
gatccagcc	aaccagaaag	atcttcaaga	agaccccgca	ggcagcggac	cagtgaaagc	480
cgtgatttat	gicacaatggc	aaatgggatt	gaagacigtg	atgtcagcc	acctaaagaa	540
aagaaatcca	agttagcataa	aaaaagaaaa	cgcicccaagg	ccaagcagga	aagggaaagct	600
tcacctgttg	agtttgcata	agatcctaat	gaacctacat	actgtttatg	caaccaagtg	660
tcttatgggg	agaatgtatgg	atgtgacaat	gaacagtgic	caatgtaaatg	gtttcacttt	720
tcatgtgttt	cacttacca	taaaccaaag	ggggaaatgtt	atgtccaaaa	gtgcagggga	780
gataatgaga	aaacaatgg	caaaagtact	gaaaagacaa	aaaaggatag	aagatcgagg	840

<210> 6

<211> 1078

<212> DNA

<213> human embryonic brain cDNA library

<220>

<221> CDS

<222> (92)..(931)

<400> 6

tccaaagctga	gttgtaggccc	cgcggcggcc	gcggccggtg	catgtgcggc	tgcgtggatgc	60					
ggaggcggcg	gcgacggcgc	ggatcgccag	g	atg	tta	ggg	cag	cag	cag	cag	112

11/13

Met	Leu	Gly	Gln	Gln	Gln	Gln
1						5
caa ctg tac tcg tcg gcc gcg ctc ctc acc acc ggg gag cgg agc cgg ctg						
Gln Leu Tyr Ser Ser Ala Ala Leu Leu Thr Gly Glu Arg Ser Arg Leu						
10	15					20
ctc acc tgc tac gtg cag gac tac ctt gag tgc gtg gag tcg ctg ccc						
Leu Thr Cys Tyr Val Gln Asp Tyr Leu Glu Cys Val Glu Ser Leu Pro						
25	30					35
cac gac atg cag agg aac gtg tct gtg ctg cga gag ctg gac aac aaa						
His Asp Met Gln Arg Asn Val Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp Asn Lys						
40	45					55
tat caa gaa acg tta aag gaa att gat gat gtc tac gaa aaa tat aag						
Tyr Gln Glu Thr Leu Lys Glu Ile Asp Asp Val Tyr Glu Lys Tyr Lys						
60	65					70
aaa gaa gat gat tta aac cag aag aaa cgt cta cag cag ctt ctc cag						
Lys Glu Asp Asp Leu Asn Gln Lys Lys Arg Leu Gln Gln Leu Gln						
75	80					85
aga gca cta att aat agt caa gaa ttg gga gat gaa aaa ata cag att						
Arg Ala Leu Ile Asn Ser Gln Glu Leu Gly Asp Glu Lys Ile Gln Ile						
90	95					100
gtt aca caa atg ctc gaa ttg gtg gaa aat cgg gca aga caa atg gag						
Val Thr Gln Met Leu Glu Leu Val Glu Asn Arg Ala Arg Gln Met Glu						
105	110					115
ttt cac tca cag tgg ttc caa gat cct gct gaa agt gaa cga gcc tca						
Leu His Ser Gln Cys Phe Gln Asp Pro Ala Glu Ser Glu Arg Ala Ser						
120	125					135
gat aaa gca aag atg gat tcc agc caa cca gaa aga tct tca aga aga						
Asp Lys Ala Lys Met Asp Ser Ser Gln Pro Glu Arg Ser Ser Arg Arg						
140	145					150

12/13

ccc cgc agg cag cg acc agt gaa agc cgt gat tta tgt cac atg gca	592
Pro Arg Arg Gin Arg Thr Ser Glu Ser Arg Asp Leu Cys His Met Ala	
155 160 165	
aat ggg att gaa gac tgt gat gat cag cca cct aaa gaa aag aaa tcc	640
Asn Gly Ile Glu Asp Cys Asp Asp Gln Pro Pro Lys Glu Lys Lys Ser	
170 175 180	
aag tca gca aag aaa aag aaa cgc tcc aag gcc aag cag gaa agg gaa	688
Lys Ser Ala Lys Lys Lys Arg Ser Lys Ala Lys Gln Glu Arg Glu	
185 190 195	
gct tca cct gtt gag ttt gca ata gat cct aat gaa cct aca tac tgc	736
Ala Ser Pro Val Glu Phe Ala Ile Asp Pro Asn Glu Pro Thr Tyr Cys	
200 205 210 215	
tta tgc aac caa gtg tct tat ggg gag atg ata gga tgt gac aat gaa	784
Leu Cys Asn Gln Val Ser Tyr Gly Glu Met Ile Gly Cys Asp Asn Glu	
220 225 230	
cag tgt cca att gaa tgg ttt cac ttt tca tgt gtt tca ctt acc tat	832
Gln Cys Pro Ile Glu trp Phe His Phe Ser Cys Val Ser Leu Thr Tyr	
235 240 245	
aaa cca aag ggg aaa tgg tat tgc cca aag tgc agg gga gat aat gag	880
Lys Pro Lys Gly Lys trp Tyr Cys Pro Lys Cys Arg Gly Asp Asn Glu	
250 255 260	
aaa aca atg gac aaa agt act gaa aag aca aaa aag gat aga aga tgc	928
Lys Thr Met Asp Lys Ser Thr Glu Lys Thr Lys Lys Asp Arg Arg Ser	
265 270 275	
agg tagtaaaggc catccacatt ttaaagggtt atttgactat tatataatcc	981
Arg	
280	
gtttgctttc agaaaaatgtt tttagggtaaa tgcataagac taigcaataa ttatataatca	1041
tttagtattaa tggtgattaa aaagtgttgc tactttg	1078

13/13

<210> 7
<211> 10
<212> DNA
<213> PCR primer sequence for TSC403
<400> 7
gatc~~t~~gacac 10

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> PCR primer P1
<400> 8
gatcgga~~t~~cc aggaggatgc ggg~~t~~ccgg 28

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> PCR primer P2
<400> 9
gatcc~~t~~cgag ttact~~t~~gggt ggct~~t~~gtct 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/00419A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 98/23747, A (Schering Corp.), 4 June, 1998 (04. 06. 98) & AU, 98/53564, A	1-7, 10-12
P, X	Cancer Res. 58[16] (1998 Aug) Ozaki K. et al., "Isolation and Characterization of a Novel Human Lung-specific Gene Homologous to Lysosomal Membrane Glycoproteins 1 and 2: Significantly Increased Expression in Cancers of Various Tissues" p.3499-3503	1-7, 10-12
X A	WO, 97/21809, A (Univ. Technologies Int. Inc.), 19 June, 1997 (19. 06. 97) & EP, 86540, A1	16-18, 23 13-15, 21, 22
P, X	Cytogenet. Cell. Genet. 83 (1998) Shimada Y. et al., "Cloning of Novel Gene (ING1L) homologous to ING1, a Candidate Tumorsuppressor" p.232-235	13-18, 21-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
• A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	• T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
• E* earlier document but published on or after the international filing date	• X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
• L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	• Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
• O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	• &* document member of the same patent family
• P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 May, 1999 (18. 05. 99)Date of mailing of the international search report
1 June, 1999 (01. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/00419

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8, 9, 19, 20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
They pertain to diagnostic methods for the human body.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 98/23747, A (Schering Corp.) 4.6月. 1998(04.06.98) & AU, 98/53564, A	1-7, 10-12
P, X	Cancer Res. 58[16] (1998 Aug) Ozaki K. et al. "Isolation and Characterization of a Novel Human Lung-specific Gene Homologous to Lysosomal Membrane Glycoproteins 1 and 2: Significantly Increased Expression in Cancers of Various Tissues" p. 3499-3503	1-7, 10-12
X A	WO, 97/21809, A (Univ. Technologies Int. Inc,) 19.6.1997(19.06.97) & EP, 86540, A1	16-18, 23 13-15, 21, 22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 99

国際調査報告の発送日

01.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

深草 亜子

4 B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Cytogenet. Cell. Genet. 83 (1998) Shimada Y. et al. "Cloning of Novel Gene (ING1L) homologous to ING1, a Candidate Tumorsuppressor" p. 232-235	13-18, 21-23

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 8, 9, 19, 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

人の診断方法に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式 PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

